



**Neue Enzyme für ein altes Organell:
Kryptische peroxisomale Lokalisationssignale in Pilzen**

Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

Dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Johannes Freitag
aus Fulda

Marburg/Lahn, 2013

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von März 2009 bis Februar 2013 unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Michael Bölker an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

angenommen am: 21. 08. 2013

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachter: Prof. Dr. Uwe Maier

Drittgutachter: Prof. Dr. Anke Becker

Tag der mündlichen Prüfung am: 23. 08. 2013

Teile dieser Arbeit werden/wurden in den folgenden Artikeln veröffentlicht:

Freitag, J., Ast, J., Linne, U., Stehlik, T., Leisge, E., Bölker, M. und Sandrock, B. (2013)
Contribution of peroxisomes to glycolipid synthesis in *Ustilago maydis*. (in Arbeit)

Freitag, J., Ast, J. und Bölker, M. (2012) Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi. *Nature* **485**, 7399, 522-525.

Weitere Veröffentlichungen:

Freitag, J.*, Lanver, D.*, Böhmer, C., Schink, K. O., Bölker, M., und Sandrock, B.
(2011) Septation of infectious hyphae is critical for appressorium formation and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **7**, 5.

Heimel, K.*, Freitag, J.*, Hampel, M., Ast, J., Bölker, M. und Kämper, J. (2013)
Crosstalk of the unfolded protein response and regulatory pathways controlling pathogenic development in *Ustilago maydis*. (in Revision)

* zu gleichen Teilen beigetragen

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Neue Enzyme für ein altes Organell: Kryptische Lokalisationssignale für Peroxisomen in Pilzen“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 1. 7. 2013

Johannes Freitag

Für Marie-Kurt und Oscar (und auch Lara)

Zusammenfassung

Peroxisomen sind nahezu ubiquitäre, eukaryotische Zellorganellen, die am Abbau von Fettsäuren und an der Entgiftung des dabei entstehenden Wasserstoffperoxids beteiligt sind. Neben dieser generellen Funktion beherbergen die Peroxisomen weitere Stoffwechselwege. Dazu zählen Teile des Glyoxylatwegs in Pflanzen und Pilzen und Stoffwechselwege für die Bildung von Sekundärmetaboliten. Eine Sonderform der Peroxisomen sind die Glycosomen, die in Trypanosomen identifiziert werden konnten und einen Großteil der glykolytischen Enzyme enthalten.

Peroxisomale Matrixproteine enthalten entweder carboxyterminale oder aminoternale PTS („peroxisomal targeting signal“)-Motive (C-terminal: PTS1; N-terminal: PTS2). Diese werden von zytoplasmatischen Rezeptoren erkannt, die gefaltete und sogar im Komplex vorliegende Proteine in die Peroxisomen überführen.

In dem pflanzenpathogenen Basidiomyceten *Ustilago maydis* konnten im Verlauf dieser Arbeit kryptische PTS1-Motive in einer Reihe von Enzymen aus der Glykolyse bzw. Gluconeogenese identifiziert werden. Peroxisomale Isoformen dieser Enzyme entstehen durch alternatives Spleißen oder durch Überlesen von Stopcodons während der Translation. Eine bioinformatische Analyse ergab, dass in einer Vielzahl von Pilzen Isoformen glykolytischer Enzyme mit PTS1-Motiv gebildet werden, wobei die Mechanismen zur Herstellung dieser Isoformen in unterschiedlichen Spezies variieren. Zudem wurden in einigen glykolytischen Enzymen ungewöhnliche PTS1-Motive gefunden, die vom bisher gültigen Konsensus für PTS1-Motive abweichen und ebenfalls eine duale Lokalisierung der Enzyme in Peroxisomen und dem Zytoplasma hervorrufen können.

Bei der genaueren Charakterisierung der Peroxisomen in *U. maydis* fiel auf, dass diese Organellen nicht nur für die β -Oxidation von Fettsäuren benötigt werden, sondern auch eine Funktion beim Zuckerstoffwechsel und der biotrophen Interaktion mit der Wirtspflanze Mais haben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Peroxisomen in *U. maydis* an der Synthese eines extrazellulären Glykolipids beteiligt sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass die Peroxisomen in Pilzen durch eine größere metabolische Vielfalt charakterisiert sind, als bisher angenommen wurde. Die Identifizierung kryptischer PTS1-Motive in Enzymen aus der Glykolyse lässt die Vermutung zu, dass Peroxisomen auch in anderen Organismen noch weitere unerwartete Proteine beinhalten.

Summary

Peroxisomes are near-ubiquitous eukaryotic organelles with a general function in the β -oxidation of fatty acids and hydrogen peroxide detoxification. Additionally peroxisomes exhibit more specific metabolic function in different organisms including parts of the reactions of the glyoxylate cycle in plants and fungi and the production of secondary metabolites. A special type of peroxisomes has been identified in trypanosomes. In these parasites the majority of glycolytic enzymes is localized in peroxisomes.

All types of peroxisomes are characterized by a unique protein import system. Peroxisomal matrix proteins contain C-terminal or N-terminal PTS (peroxisomal targeting signal) motifs (C-terminal: PTS1; N-Terminal: PTS2), which are recognized by soluble receptors mediating the import of fully folded and even oligomeric proteins.

Studies on mRNA processing in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* lead to the unexpected discovery of isoforms of glycolytic enzymes harboring PTS1 motifs. These isoforms result from alternative splicing and translational read-through, respectively. A bioinformatic survey revealed the presence of such isoforms in many fungal species, although the mechanisms giving rise to PTS1 motifs vary between species. Some glycolytic enzymes were shown to possess low efficiency PTS1 motifs differing from the PTS1 consensus sequence. These motifs might also lead to dual cytoplasmic and peroxisomal targeting similar to the already described mechanisms.

More detailed analysis of peroxisomes in *U. maydis* established additional functions of these organelles in sugar metabolism and pathogenic development beside their prominent role in the breakdown of fatty acids. Moreover, it could be demonstrated that peroxisomes participate in the production of glycolipids in *U. maydis*.

The data obtained here suggests novel metabolic functions for peroxisomes at least in fungi. The identification of cryptic PTS1 motifs in glycolytic enzymes in fungi indicates that peroxisomes of other organisms likely contain a variety of unexpected proteins.

Abkürzungsverzeichnis

AAA-	„ATPase associated with diverse cellular	NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
ATPase	activities"	NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Abb.	Abbildung	Nat	Nourseothricin
ADP	Adenosindiposphat	NMD	"nonsense mediated decay"
AMP	Adenosinmonphosphat	Nos	Nopalin Synthase
Amp	Ampicillin	OD600	optische Dichte bei 600 nm
ATP	Adenosintriphosphat	ORF	„open reading frame"
bp	Basenpaare	pA	polyA
bzw.	beziehungsweise	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
C	"Carbon"	PCR	„polymerase chain reaction"
C-terminal	carboxyterminal	PEPCK	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
C-Terminus	Carboxyterminus	PFK	Phosphofructokinase
Cbx	Carboxin	PGK	Phosphoglyceratkinase
cDNA	„complementary DNA“	Phleo	Phleomycin
CoA	Coenzym A	PMP	„peroxisomal membrane protein"
DIC	„differential interface contrast"	ppi	Peptidylprolyl Isomerase
DMSO	Dimethylsulfoxid	PTS	„peroxisomal targeting signal"
DNA	Desoxyribonukleinsäure	qRT-PCR	quantitative „real-time“ PCR
EST	„expressed sequence tag"	R	Resistenz
FBA	Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase	RING	„really interesting new gene"
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase	RNA	Ribonukleinsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase	RT	„reverse transcription"
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	SDS	„sodium dodecyl sulfate“
GPD	Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase	SH3	SRC Homology 3
H2Obid.	zweifach destilliertes Wasser	Tab.	Tabelle
Hyg	Hygromycin	TPR	„tetratricopeptide repeat"
ip	„iron-sulfur-protein"	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
kb	Kilobasenpaar(e)	U	Unit
kD	Kilodalton	UA	Ustilaginsäuren
mCherry	„monomeric cherry"	Upm	Umdrehungen pro Minute
MDH	Malatdehydrogenase	UTR	„untranslated region"
MEL	Mannosylerythrithol Lipide	WT	Wildtyp
min	Minute(n)	z.B.	zum Beispiel
N-terminal	aminoterminal	Δ	Deletion
N-Terminus	Aminotermminus		

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	II
Abkürzungsverzeichnis.....	III
Inhaltsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Peroxisomen: Konservierte eukaryotische Organellen mit vielfältiger Funktion	1
1.1.1 Der peroxisomale Proteinimport und die Biogenese von Peroxisomen	2
1.1.2 Peroxisomen haben vielfältige und teilweise hochspezialisierte Funktionen	6
1.1.3 Peroxisomale Proteine mit dualer Lokalisierung	8
1.2 Glykolyse und Gluconeogenese: Eine Übersicht	9
1.3 <i>Ustilago maydis</i>	11
1.3.1 Der Lebenszyklus von <i>U. maydis</i> ist mit seiner pathogenen Entwicklung verknüpft	12
1.3.2 <i>U. maydis</i> als Modellorganismus für die Molekular- und Zellbiologie	14
1.4 Fragestellung	15
2 Ergebnisse	15
2.1 Die Untersuchung von PolyA-Signalen in <i>U. maydis</i> führte zur Identifizierung alternativer Transkript-Varianten für die GAPDH	15
2.1.1 Etablierung eines Testsystems zur Untersuchung von PolyA-Signalen in <i>U. maydis</i>	15
2.1.2 Alternative Transkripte von <i>gapd</i> entstehen durch differentielles Spleißen und alternative Polyadenylierung in <i>U. maydis</i>	17
2.2 Versteckte Varianten der glykolytischen Enzyme GAPDH und PGK enthalten Zielsteuerungssequenzen für Peroxisomen in <i>U. maydis</i>	19
2.2.1 Alternatives Spleißen führt zur Bildung einer peroxisomalen Isoform von GAPDH	19
2.2.2 Das Überlesen des Stopcodons führt zur Bildung einer peroxisomalen PGK Isoform	21
2.2.3 Das Überlesen des Stopcodons erzeugt einen erheblichen Anteil peroxisomaler PGK	23
2.3 Peroxisomale Isoformen von GAPDH und PGK sind in vielen Pilzen weit verbreitet ...	25
2.3.1 Peroxisomale Isoformen von GAPDH und PGK aus <i>A. nidulans</i>	27
2.3.2 Hinweise auf peroxisomale Varianten von GAPDH und PGK in EST-Banken.....	28
2.3.3 PGK aus <i>Botrytis cinerea</i> : Ein Hinweis auf die Evolution der Mechanismen zur Generierung der PTS1-Motive in glykolytischen Enzymen.....	29
2.3.4 <i>Phycomyces blakesleeanus</i> besitzt drei paraloge Gene für die GAPDH	30

2.4	Charakterisierung von Peroxinen in <i>U. maydis</i>	32
2.4.1	<i>U. maydis</i> codiert für zwei PTS1-Rezeptoren.....	32
2.4.2	Peroxisomaler Import von mCherry-SKL in <i>pex</i> -Mutanten	33
2.4.3	Funktionelle Peroxisomen haben eine Funktion beim Zucker- und beim Fettsäuremetabolismus in <i>U. maydis</i>	34
2.4.4	Peroxisomen spielen während der pathogenen Entwicklung von <i>U. maydis</i> eine Rolle ..	34
2.5	Die peroxisomalen Isoformen von GAPDH und PGK haben eine Funktion bei der biotrophen Entwicklung von <i>U. maydis</i>	36
2.6	Die peroxisomale GAPDH hat überlappende Funktionen mit anderen peroxisomalen NAD abhängigen Dehydrogenasen	39
2.6.1	Peroxisomale NAD abhängige Dehydrogenasen in <i>U. maydis</i>	39
2.6.2	Überlappende Funktionen der peroxisomalen NAD abhängigen Dehydrogenasen	40
2.6.3	Peroxisomen beeinflussen das Wachstum von <i>U. maydis</i> auf verschiedenen Zuckern	44
2.7	GAPDH und PGK sind Teil eines größeren metabolischen Netzwerks in Peroxisomen 45	
2.7.1	Peroxisomale Varianten von TPI in <i>U. maydis</i> und <i>A. nidulans</i>	45
2.7.2	Die Fructose-1,6-bisphosphat Aldolasen von <i>U. maydis</i> und <i>A. nidulans</i> enthalten funktionelle PTS1-Motive	47
2.7.3	Das Enzym Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK) aus <i>U. maydis</i> enthält ein PTS1-Motiv	48
2.8	Anzeichen für peroxisomalen Import von PGK-Homologen aus <i>Homo sapiens</i> und <i>Bos taurus</i>	50
2.9	Die Synthese von Mannosylerythritol Lipiden (MEL) findet zum Teil in den Peroxisomen von <i>U. maydis</i> statt	51
2.9.1	Die beiden Acyltransferasen Mac1 und Mac2 lokalisieren in den Peroxisomen von <i>U. maydis</i>	52
2.9.2	Die zytoplasmatische Lokalisierung von Mac1 und Mac2 führt zur Synthese abgewandelter MELs	53
2.9.3	Homologe von Mac1 und Mac2 aus <i>A. nidulans</i> enthalten ebenfalls PTS1-Motive	55
3	Diskussion	57
3.1	Die Bedeutung und Verbreitung von alternativem Spleißen in Pilzen	57
3.2	Gezieltes Überlesen von Stopcodons zur Erzeugung alternativer Isoformen	59
3.3	Ein erweitertes peroxisomales Proteom bedingt durch die duale Lokalisierung von Proteinen und ungewöhnliche PTS1-Motive	62
3.3.1	Mechanismen zur dualen Lokalisierung von Proteinen	62
3.3.2	Ungewöhnliche PTS1-Motive.....	65
3.4	Mögliche Funktionen der peroxisomalen Isoformen glykolytischer/gluconeogenetischer Enzyme in Peroxisomen von Pilzen	66

3.4.1	Die peroxisomale Isoform von GAPDH als Teil eines Redox-Shuttles	66
3.4.2	Glykolyse oder „Moonlighting“	68
3.4.3	Die konstitutiv hohe Zahl von Peroxisomen könnte die duale Lokalisierung glykolytischer Enzyme in vielen Pilzen begründen	70
3.5	Peroxisomen haben in <i>U. maydis</i> vielfältige Funktionen	72
3.5.1	Funktionelle Peroxisomen sind entscheidend für die Virulenz von <i>U. maydis</i>	72
3.5.2	Peroxisomen spielen in <i>U. maydis</i> eine Rolle beim Metabolismus von Zucker	73
3.5.3	<i>U. maydis</i> codiert für zwei Pex5-Homologe mit unterschiedlicher Funktion	74
3.6	Kompartimentierung der Glykolipidsynthese in <i>U. maydis</i>	75
4	Material und Methoden	77
4.1	Materialien mit Bezugsquellen	77
4.1.1	Chemikalien	77
4.1.2	Antikörper und Enzyme	77
4.1.3	Puffer und Lösungen	77
4.1.4	Kits	78
4.1.5	Geräte	78
4.1.6	Sonstige Materialien	78
4.2	Kultivierung von Mikroorganismen	78
4.2.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	79
4.2.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	79
4.2.3	Kultivierung von <i>U. maydis</i>	80
4.2.4	Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Kulturen	81
4.3	Stämme, Plasmide und Oligonukleotide	81
4.3.1	<i>E. coli</i> Stämme	81
4.3.2	<i>S. cerevisiae</i> Stämme	81
4.3.3	<i>U. maydis</i> Stämme	82
4.3.4	Plasmide	86
4.3.5	Oligonukleotide	90
4.4	Mikrobiologische Methoden	91
4.4.1	Transformation von <i>E. coli</i>	91
4.4.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	92
4.4.3	Transformation von <i>U. maydis</i>	92
4.4.4	Wachstumstests auf Fest- und in Flüssigmedium	93
4.4.5	Test auf filamentöses Wachstum auf PD-Aktivkohle-Medium	94
4.4.6	Infektion von <i>Zea mays</i> mit <i>U. maydis</i>	94

4.5	Genetische Methoden	95
4.5.1	Deletion von Genen oder Genfragmenten mittels homologer Rekombination	95
4.5.2	Integration von Konstrukten in den <i>ip</i> -Locus von <i>U. maydis</i>	95
4.6	Molekularbiologische Methoden	96
4.6.1	Restriktion und Dephosphorylierung von DNA	96
4.6.2	Ligation von DNA	96
4.6.3	Sequenzierung von DNA	96
4.6.4	Agarosegel-Elektrophorese	97
4.6.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	98
4.6.6	Quantitative PCR (qRT-PCR) und Untersuchung von cDNA	98
4.6.7	Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	99
4.6.8	Isolierung von genomischer DNA aus <i>U. maydis</i>	100
4.6.9	Isolierung von RNA aus <i>U. maydis</i>	100
4.6.10	Transfer und Nachweis von DNA auf Membranen (Southern Blot)	101
4.6.11	Transfer und Nachweis von RNA auf Membranen (Northern Blot)	102
4.7	Biochemische Methoden	103
4.7.1	Isolierung von denaturierten Proteinen aus <i>U. maydis</i>	103
4.7.2	Isolierung nativer Proteine aus <i>U. maydis</i>	103
4.7.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	104
4.7.4	Elektrophorese von Proteinen	104
4.7.5	Transfer und Nachweis von Proteinen (Western Blot)	105
4.7.6	Isolierung von Glykolipiden aus <i>U. maydis</i>	106
4.7.7	Auftrennung und Nachweis der Glykolipide mit Dünnschichtchromatographie (DC)	106
4.7.8	Massenspektrometrische Untersuchungen der Glykolipide	106
4.8	Mikroskopie	107
4.9	Bioinformatik	107
5	Literatur	108
6	Anhang	134

1 Einleitung

1.1 Peroxisomen: Konservierte eukaryotische Organellen mit vielfältiger Funktion

Eukaryotische Zellen enthalten Zellkompartimente (Organellen), die begrenzt durch mindestens eine Membran einen abgeschlossenen Reaktionsraum mit spezialisierten Aufgaben bilden. Eine Gattung nahezu ubiquitärer Organellen sind die Peroxisomen, die erstmalig als sogenannte „Microbodies“ bei einer ultrastrukturellen Studie von Zellen aus Mäusenieren beschrieben werden konnten (Rhodin, 1954). Die Isolierung und genauere Charakterisierung von Peroxisomen aus der Rattenleber gelang de Duve und Baudhuin in den frühen sechziger Jahren (de Duve & Baudhuin, 1966). Sie erkannten, dass Peroxisomen mehrere Enzyme beherbergen, die an der Produktion und dem Abbau von Wasserstoffperoxid beteiligt sind. Diese Enzymaktivitäten waren maßgeblich für die Namensgebung der Organellen.

Lange herrschte Unklarheit über den evolutionären Ursprung der Peroxisomen. Ihre weite Verbreitung in nahezu allen eukaryotischen Organismengruppen spricht für die Ursprünglichkeit von Peroxisomen, die zusammen mit der Anreicherung von atmosphärischem Sauerstoff (Sauerstoffkatastrophe) vor mehr als zwei Milliarden Jahren entstanden sein könnten (de Duve, 1969). Nicht geklärt war jedoch, ob es sich bei Peroxisomen um Endosymbionten handelt oder ob sie sich aus zellulären Endomembranen ableiten (Tabak *et al*, 2006). Im Gegensatz zu Mitochondrien und Chloroplasten enthalten Peroxisomen keine eigene DNA, was als Hinweis gegen eine Entstehung durch Endosymbiose gelten kann. Ferner sind Peroxisomen anders als Mitochondrien und Chloroplasten nur von einer einfachen Membran umgeben. Jedoch sind sie in der Lage, sich zu vermehren und können bei der Zellteilung von Mutter- auf Tochterzellen weitergegeben werden (Fagarasanu *et al*, 2010). Neuere Arbeiten legen nahe, dass Peroxisomen *de novo* vom Endoplasmatischen Reticulum (ER) gebildet werden (Tabak *et al*, 2008). In der Hefe *Yarrowia lipolytica* bilden Mutanten mit Defekten im ER-Transport keine Peroxisomen und zwei typisch peroxisomale Proteine sind im ER lokalisiert (Titorenko & Rachubinski, 1998). Mit Hilfe einer konditionalen Mutante konnte gezeigt werden, dass in *Saccharomyces cerevisiae* ein peroxisomales Membranprotein bei der *de novo* Entstehung der Peroxisomen

zunächst im ER und später in den Peroxisomen lokalisiert ist (Hoepfner *et al*, 2005). In der verwendeten Mutante fehlen laut dieser Studie auch Überbleibsel von Peroxisomen ohne Matrixproteine („ghosts“), ein Anzeichen für eine Assemblierung von Peroxisomen ausgehend vom ER. Aus phylogenetischen Studien geht überdies hervor, dass Komponenten der Importmaschinerie peroxisomaler Matrixproteine eine deutliche Ähnlichkeit zum ERAD-System (endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) des ERs aufweisen (Gabaldon *et al*, 2006; Schluter *et al*, 2006).

Erst vor kurzem wurden zwei Typen von Vesikeln beschrieben, die auf unterschiedlichen Wegen vom ER ausgehend durch Fusion Prä-Peroxisomen generieren. Beide Vesikeltypen enthalten verschiedene Proteine, die für den Import von peroxisomalen Matrixproteinen notwendig sind (Van der Zand *et al*, 2012). Demnach wäre der aktive Import von Matrixproteinen erst nach der Fusion der beiden unterschiedlichen Populationen von Vesikeln möglich.

Diese und viele weitere Arbeiten führten zu der derzeit angenommenen Vorstellung, dass die peroxisomale Membran und einige peroxisomale Membranproteine ihren Ursprung im ER haben, während die löslichen Matrixproteine und weitere Membranproteine aus dem Zytoplasma importiert werden (Nuttall *et al*, 2011; Rucktäschel *et al*, 2011; siehe auch im nächsten Kapitel). Peroxisomen stellen daher ein einzigartiges Organell dar, welches vom Endomembran-Netzwerk des ER abhängt und trotzdem seine Matrixproteine ähnlich den Mitochondrien und Chloroplasten mithilfe eigener Transportsysteme importiert (De Duve, 2007).

1.1.1 Der peroxisomale Proteinimport und die Biogenese von Peroxisomen

Mehrere Systeme werden für den Transport von Proteinen in die Peroxisomen benutzt (Abb. 1). Dabei unterscheiden sich der Import von Membranproteinen und löslichen Proteinen deutlich voneinander (Rucktäschel *et al*, 2011). Eine wichtige Voraussetzung für die Lokalisierung von Proteinen an bestimmten Orten in Zellen ist in der Regel eine eindeutige Information, die in der Sequenz der Proteine enthalten ist (Wickner & Schekman, 2005; Abb.1).

Von den peroxisomalen Matrixproteinen weist der überwiegende Anteil ein kurzes konserviertes C-terminales Sequenzmotiv auf, das als PTS1 bezeichnet wurde (Brocard & Hartig, 2006; Gould *et al*, 1990). Zuerst wurde ein kurzes Peptid bestehend aus Serin-Lysin-Leucin (SKL) beschrieben, das hinreichend für die Translokation von Proteinen in das Lumen

von Peroxisomen ist (Gould *et al*, 1989; Keller *et al*, 1987). In nachfolgenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass auch Varianten dieser Sequenz mit dem Consensus S/A/P-R/K-L/M/I als Importsignal dienen können und außerdem der Sequenzkontext des C-terminalen Tripeptids wichtig für die Effizienz des Imports ist (Brocard & Hartig, 2006).

Ein charakteristisches Merkmal von Proteinen mit PTS1-Motiv ist, dass sie in voll gefaltetem Zustand mit gebundenem Cofaktor und sogar als Oligomere importiert werden können (Glover *et al*, 1994; Häusler *et al*, 1996; McNew & Goodman, 1994). Dies unterscheidet den peroxisomalen Import vom Import in Mitochondrien, Chloroplasten oder ins ER und ist eher vergleichbar mit dem Transport von Proteinen in den Zellkern (Wickner & Schekman, 2005). In ähnlicher Weise werden auch peroxisomale Matrixproteine, die ein PTS2-Motiv mit der Konsensus-Sequenz RL/I-X₅-HL/Q am N-Terminus besitzen, importiert (Lazarow, 2006). Proteine mit PTS2 sind weniger häufig als Proteine mit PTS1 und in *Caenorhabditis elegans* und einigen Algen fehlen sie sogar ganz (Gonzalez *et al*, 2011; Motley *et al*, 2000). Außerdem sind einige Matrixproteine bekannt, die unabhängig von PTS-Motiven in die Peroxisomen überführt werden können (Van der Klei & Veenhuis, 2006a). In diesen Fällen erfolgt der Import durch Interaktion mit einem anderen Protein mit PTS-Motiv oder mit Hilfe bisher weniger definierte Sequenzmotive (Glover *et al*, 1994; McNew & Goodman, 1994; van der Klei & Veenhuis, 2006a).

Genetische Studien in einzelligen Pilzen trugen entscheidend zum Verständnis des Transportsystems der peroxisomalen Matrixproteine bei, da in *S. cerevisiae* und später auch in anderen Pilzen Mutanten identifiziert und charakterisiert werden konnten, die keine funktionellen Peroxisomen mehr aufweisen (Cregg *et al*, 1990; Erdmann *et al*, 1989; Liu *et al*, 1992). Diese Mutanten werden einheitlich als *pex*-Mutanten bezeichnet und die zugehörigen Proteine als Peroxine (Distel *et al*, 1996). Bislang wurden in den unterschiedlichen Organismen mehr als dreißig zum Teil stark konservierte Peroxine gefunden, die erforderlich für die Biogenese und Proliferation von Peroxisomen sind (Platta & Erdmann, 2007).

Proteine mit PTS1 werden durch das Rezeptorprotein Pex5, das sechs TPR (tetratricopeptide)-Wiederholungen mit PTS1 Affinität aufweist, im Zytoplasma erkannt und gebunden (Brocard *et al*, 1994; Gatto *et al*, 2000; Gould *et al*, 1996; Terlecky *et al*, 1995; Abb. 1c). Durch seine Affinität zu der ins Zytoplasma exponierten SH3-Domäne des integralen peroxisomalen Membranproteins (PMP) Pex13 und zu Pex14 wird beladenes Pex5 an die Membran rekrutiert (Erdmann & Blobel, 1996; Gould *et al*, 1996; Mayer, 2001). Zusammen mit weiteren Peroxinen (Pex2, Pex10 und Pex12), die als RING-(really interesting

new gene)-Finger Komplex bezeichnet werden, assembliert sich in *S. cerevisiae* und wahrscheinlich sehr ähnlich auch in den meisten anderen Organismen ein peroxisomales Importomer (Rucktäschel *et al*, 2011).

Pex5 wird dabei vermutlich in die peroxisomale Membran integriert und bildet so eine transiente Pore aus (Abb. 1c). Hinweise hierfür ergaben die Aufreinigung und die *in vitro* Rekonstitution von Pex5-Komplexen aus *S. cerevisiae* (Meinecke *et al*, 2010). Untersuchungen an diesen Komplexen zeigten, dass sie in Anwesenheit des luminalen Peroxins Pex8 nur transiente Poreneigenschaften besitzen, während ein aus *pex8* Deletionsmutanten gereinigter Komplex eine stabile Pore mit einem Durchmesser von 9 nm bildet. Pex8 ist notwendig für die Auflösung der Interaktion zwischen PTS1-Proteinen und Pex5 (Wang *et al*, 2003). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass Goldpartikel, gekoppelt an ein Protein mit PTS1-Motiv und einem Durchmesser von 9 nm, in Peroxisomen importiert werden können (Walton *et al*, 1995).

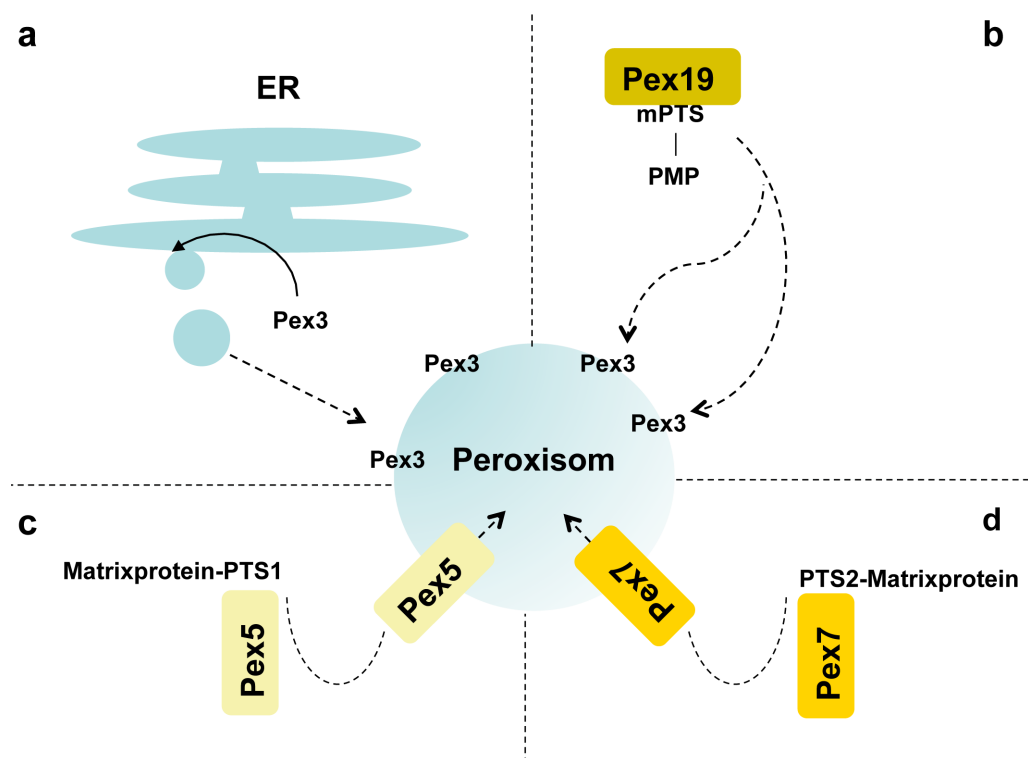


Abbildung 1: Die unterschiedlichen Importwege peroxisomaler Proteine

a; Einige peroxisomale Membranproteine (z. B. Pex3; Pex15) werden ins ER importiert und können über die Abschnürung präperoxisomaler Vesikel in reife Peroxisomen gelangen. Die peroxisomale Membran hat ihren Ursprung vermutlich ebenfalls im ER.

b; Die Mehrzahl der PMPs wird von Pex19 im Zytoplasma erkannt. Nach der Anlagerung von Pex19 an Pex3 werden diese PMPs in die peroxisomale Membran oder in die Membran von peroxisomalen Vorläufern inseriert.

c; Pex5 bindet PTS1-Proteine im Zytoplasma, inseriert in die peroxisomale Membran und bildet dort eine multimere Pore zum Importieren der PTS1-Proteine.

d; Pex7 bindet PTS2-Proteine im Zytoplasma. Der Mechanismus des Transports ist noch nicht genau untersucht, könnte aber Pex5 ähneln.

Referenzen für a-d sind im Text zu finden.

Nach der Translokation von gebundenen peroxisomalen Matrixproteinen wird Pex5 wieder ins Zytoplasma freigesetzt (Dammai & Subramani, 2001). Die Energie für diese Freisetzung wird von den AAA-ATPasen Pex1 und Pex6 bereitgestellt, die in *S. cerevisiae* durch Interaktion mit dem Membranprotein Pex15 an Peroxisomen rekrutiert werden (Birschmann *et al*, 2003; Platta *et al*, 2005). Dabei erfolgt eine Monoubiquitinierung, die kritisch für die Freisetzung von Pex5 aus der Membran ist (Platta *et al*, 2007). Als E3-Ubiquitinligasen werden Komponenten aus dem RING-Finger Komplex diskutiert (Platta *et al*, 2009; Williams *et al*, 2008). Andere Arbeiten implizieren, dass Pex5 an sein Kargo gebunden in die Matrix der Peroxisomen überführt wird (Dammai & Subramani, 2001).

Proteine mit PTS2-Motiv werden von dem ebenfalls vorwiegend zytoplasmatisch lokalisierten Rezeptor Pex7 detektiert und gebunden (Kunze *et al*, 2011; Rehling *et al*, 1996). Der Importmechanismus dieser Proteine hat vermutlich Ähnlichkeiten zum Pex5 abhängigen Import, ist aber noch weitgehend unerforscht (Rucktäschel *et al*, 2011, Abb. 1d).

Peroxisomale Membranproteine enthalten meist eine Pex19 Bindestelle (mPTS), die aus einer Kombination von basischen und hydrophoben Aminosäuren besteht und werden durch das überwiegend im Zytoplasma befindliche Chaperon Pex19 erkannt (Jones *et al*, 2004; Rottensteiner *et al*, 2004; Abb. 1b). Sowohl integrale als auch periphere Membranproteine können von Pex19 gebunden werden (Fujiki *et al*, 2006). Nach der Erkennung seines Zielproteins dockt Pex19 nach der gängigen Modellvorstellung an das integrale PMP Pex3 an, um das Kargo in die peroxisomale Membran zu inserieren, wobei der Mechanismus noch nicht im Detail verstanden ist (Fang *et al*, 2004; Rucktäschel *et al*, 2011; Abb. 1b).

Für einige Proteine wurde bereits gezeigt, dass sie zunächst in die ER-Membran und dann in die peroxisomale Membran eingefügt werden. Hierzu zählen beispielsweise die Peroxine Pex3 und Pex16, die beide vermutlich während ihrer Translation ins ER inseriert und von dort in Peroxisomen überführt werden (Fujiki *et al*, 2006; Hoepfner *et al*, 2005; Kim *et al*, 2006; Abb. 1a). In den beiden Pilzen *Hansenula polymorpha* und *S. cerevisiae* werden womöglich viele PMPs, vermittelt durch Sec61 oder den GET-Komplex, zunächst in die ER-Membran überführt (Otzen *et al*, 2004; van der Zand *et al*, 2010). Pex3 und Pex19 könnten dann im ER der Sortierung von PMPs dienen. Für Pex19 ist bereits bekannt, dass es für die Bildung von peroxisomalen Vesikeln ausgehend vom ER oder die Sortierung von Proteinen in diese Vesikel benötigt wird (Lam *et al*, 2010). Am Import von peroxisomalen Proteinen sind demnach unterschiedliche Systeme beteiligt zwischen denen es allerdings Überschneidungen gibt.

Manche Peroxine spielen keine Rolle beim Import von peroxisomalen Proteinen. Sie haben jedoch entscheidende Funktionen bei der Biogenese der Peroxisomen. Zum Beispiel ist das Peroxin Pex11 für die Teilung und Proliferation der Organellen notwendig (Thoms & Erdmann, 2005). Eine Deletion von *pex11* in der Bäckerhefe resultiert in der Ausbildung von stark vergrößerten und in ihrer Menge reduzierten Peroxisomen und eine Überexpression von *pex11* bewirkt eine gesteigerte Proliferation der Peroxisomen (Erdmann & Blobel, 1995; Marshall *et al*, 1995).

Während der Proliferation vergrößern sich Peroxisomen zunächst, vermutlich durch Fusion mit vom ER stammenden Vesikeln und teilen sich anschließend (Motley & Hettema, 2007). Für die Teilung werden die Dynamin-verwandten Proteine Dnm1 und Vps1 benötigt (Hoepfner *et al*, 2001; Motley & Hettema, 2007; Nagotu *et al*, 2008). In *S. cerevisiae* wird die Vermehrung der Peroxisomen durch in Gegenwart von Lipiden stimuliert (Gurvitz & Rottensteiner, 2006). Die β -Oxidation von Fettsäuren ist ein Stoffwechselweg, der in den überwiegenden Zahl der Organismen ganz oder zumindest teilweise in Peroxisomen stattfindet (Poirier *et al*, 2006).

1.1.2 Peroxisomen haben vielfältige und teilweise hochspezialisierte Funktionen

Bei der peroxisomalen Oxidation von Fettsäuren entsteht neben reduziertem NADH giftiges Wasserstoffperoxid, das bei der Umwandlung von Acyl-CoA in Enoyl-CoA durch Acyl-CoA Oxidasen gebildet wird (Lazarow & De Duve, 1976). Das entstehende Wasserstoffperoxid wird in den Peroxisomen durch eine peroxisomale Katalase in Wasser und Sauerstoff umgesetzt (De Duve & Baudhuin, 1966).

Die β -Oxidation von Fettsäuren ist zwar eine nahezu ubiquitäre Funktion der Peroxisomen, jedoch unterscheiden sich Organismen darin, ob die Enzyme der β -Oxidation entweder ausschließlich im Peroxisom oder noch zusätzlich in den Mitochondrien vorhanden sind (Gabaldón, 2010). In Pflanzen und einigen Pilzen findet der Abbau der Fettsäuren ausschließlich in den Peroxisomen statt (Graham & Eastmond, 2002; Shen & Burger, 2009). Bei anderen Pilzen hingegen sind die Peroxisomen spezialisiert für den Abbau längerer Fettsäuren und auch in Säugetieren werden sehr lange Fettsäuren (C24:0 und C26:0) ausschließlich in Peroxisomen umgesetzt (Singh *et al*, 1984; Wanders & Waterham, 2006).

In Säugetieren sind eine ganze Reihe unterschiedlicher Funktionen der Peroxisomen entdeckt worden. Die tödliche Erbkrankheit „Zellweger Syndrom“ konnte mit der Abwesenheit funktioneller Peroxisomen und später mit Mutationen in bestimmten *pex* Genen in

Verbindung gebracht werden (Wanders & Waterham, 2006). Im Gewebe von Zellweger Patienten akkumulieren sehr lange Fettsäuren, gleichzeitig fehlt ein bestimmtes Etherlipid (Plasmalogen), das zur Entstehung von Myelin in Nervenzellen benötigt wird (Poulos *et al*, 1986; Heymans *et al*, 1983). Ferner haben die Peroxisomen der Säugetiere Funktionen bei der Koordination des Herzstoffwechsels und in Testikeln, in denen die Synthese des Sexualhormons Testosteron möglicherweise zum Teil in Peroxisomen stattfindet (Islinger *et al*, 2010). Kontrolliert wird die Proliferation und die Zusammensetzung von Peroxisomen in vielen Tieren vor allem durch die im Zellkern befindlichen Transkriptionsfaktoren der PPAR-Familie („peroxisome proliferator-activated receptor“), die durch Fettsäuren aktiviert werden können (Dreyer *et al*, 1993; Isseman *et al*, 1990).

In einer Vielzahl von Organismen befinden sich in den Peroxisomen einige Enzyme für den Metabolismus von Purinen. Die Uratoxidase katalysiert die Oxidation von Urat zu Allantoin, einen Zwischenschritt beim Abbau der Purine und führt zudem zur Produktion von Wasserstoffperoxid (Islinger *et al*, 2010). Bereits in frühen Arbeiten konnte ein elektronendichter Kern im peroxisomalen Lumen identifiziert werden, der auf Proteinkristalle des Enzyms Uratoxidase zurückgeführt werden konnte (Lata *et al*, 1977; Tsukada *et al*, 1966).

In Pflanzen haben sich in unterschiedlichen Gewebetypen spezialisierte Peroxisomen entwickelt. In photosynthetisch aktiven Geweben befinden sich im Inneren der Peroxisomen Enzyme für den Stoffwechsel von Glykolat, das bei der Photorespiration gebildet wird (Bauwe *et al*, 2010). Eine abgewandelte Gruppe der Peroxisomen sind die Glyoxysomen, die neben den Enzymen für die Oxidation von Fettsäuren noch Enzyme des Glyoxylat-Wegs enthalten und bei der Keimung Öl-haltiger Samen benötigt werden (Graham, 2008). Glyoxysomen, die entscheidend für den Stoffwechsel von C₂-Körpern sind, sind auch in Pilzen gefunden worden (Kunze *et al*, 2006; Zimmermann & Neupert, 1980).

Einzellige und filamentöse Pilze zeichnen sich durch eine große Vielfalt peroxisomaler Prozesse aus (Van der Klei & Veenhuis, 2006b). Methylo trope Hefen (z. B. *H. polymorpha*, *Pichia pastoris*) besitzen den größten Anteil Peroxisomen relativ zur Gesamtzelle, der bisher beobachtet werden konnte. In diesen Pilzen beinhalten die Peroxisomen Enzyme für den Abbau von Methanol, die in *H. polymorpha* bis zu 70% des gesamten zellulären Proteins ausmachen können und zur Ausbildung kristalliner Strukturen führen (Veenhuis *et al*, 1978; van der Klei & Veenhuis, 2006b). Außerdem sind peroxisomale Proteine in Pilzen an einer Reihe von biosynthetischen Prozessen beteiligt. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die

Synthese des Cofaktors Biotin in Pilzen und auch in Pflanzen teilweise in Peroxisomen stattfindet (Magliano *et al*, 2011; Tanabe *et al*, 2011).

Pilze sind bekannt für die Synthese einer Vielfalt von Sekundärmetaboliten (Keller *et al*, 2005). Ein bekanntes Beispiel ist das β -Lactam Antibiotikum Penicillin, welches von *Penicillium chrysogenum* und *Aspergillus nidulans* produziert wird und der Abwehr bakterieller Konkurrenz dient (Brakhage *et al*, 2004). In beiden Ascomyceten finden Teile der Biosynthese dieses Antibiotikums in den Peroxisomen statt (Müller *et al*, 1991; Spröte *et al*, 2009). Ferner konnte eine Reihe weiterer Stoffwechselwege für Sekundärmetaboliten mit Peroxisomen in Verbindung gebracht werden (Bartoszewska *et al*, 2011). Beispielsweise besitzen die Enzyme für die Biosynthese bestimmter Toxine des phytopathogenen Pilzes *Alternaria alternata* PTS1-Motive (Imazaki *et al*, 2010).

Eine hochspezialisierte Abwandlung von Peroxisomen sind die „Woronin Bodies“ mancher Ascomyceten, die bei Verletzung zum Verschluss der Septenporen verwendet werden und vor dem unkontrollierten Verlust von Zytoplasma schützen (Jedd & Chua, 2000).

1.1.3 Peroxisomale Proteine mit dualer Lokalisierung

Einige peroxisomale Enzyme/Proteine befinden sich nicht nur in den Peroxisomen, sondern sind teilweise oder überwiegend auch in anderen Organellen oder im Zytoplasma lokalisiert. So konnten beispielsweise das peroxisomale Membranprotein Pex16 aus Pflanzen und die Peroxine Pex30 bzw. Pex31 aus *P. pastoris* sowohl im ER als auch in Peroxisomen nachgewiesen werden (Karnik & Trelease, 2005; Yan *et al*, 2008).

Für eine Reihe von Stoffwechselreaktionen konnte gezeigt werden, dass sie sowohl im Peroxisom als auch in anderen Organellen oder im Zytoplasma stattfinden. Dies rührt in vielen Fällen daher, dass Enzyme mit vergleichbarer Substratspezifität unterschiedliche Zielsteuerungssequenzen enthalten. Beispielsweise sind im Genom von *S. cerevisiae* drei Malatdehydrogenasen codiert, die jeweils nur in Mitochondrien, Peroxisomen bzw. dem Zytoplasma lokalisieren (McAlister-Henn *et al*, 1995; Minard & McAlister-Henn, 1991; Van Roermund *et al*, 1995). Es können aber auch unterschiedliche Isoformen vom gleichen Gen codiert sein und durch transkriptionelle bzw. posttranskriptionelle Mechanismen unterschiedliche Zielsteuerungssequenzen erhalten. So werden peroxisomale, mitochondriale und zytoplasmatische Varianten der NADP abhängigen Isocitratdehydrogenase in *A. nidulans* durch alternative Transkriptionsstarts vom gleichen Gen aus gebildet (Szewczyk *et al*, 2001). Isoformen mit unterschiedlichem Lokalisationssignal können ebenfalls durch alternatives

Spleißen vom selben Gen aus erzeugt werden und damit zu einer dualen Lokalisation des entsprechenden Proteins in die Peroxisomen und andere Kompartimente beitragen (Mano *et al*, 2000; Strijbis *et al*, 2012). Eine weitere Möglichkeit, die Lokalisation eines Proteins zu determinieren, sind Modifikationen des Proteins nach der Translation. Die Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase Gpd1 aus *S. cerevisiae* wird in der Nähe des PTS2-Motivs phosphoryliert, was den Import in die Peroxisomen verhindert (Jung *et al*, 2010). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Proteine mehrere Lokalisierungssignale für Organellen aufweisen können, die miteinander konkurrieren (Hooks *et al*, 2012; Oda *et al*, 1982). Für diese Proteine wird angenommen, dass N-terminale Signale für Mitochondrien oder Chloroplasten eher dominant gegenüber den C-terminalen PTS1-Motiven sind (Danpure, 1997).

1.2 Glykolyse und Gluconeogenese: Eine Übersicht

Die Glykolyse und die Gluconeogenese sind zentrale, in Prokaryoten und Eukaryoten verbreitete und gegenläufige Stoffwechselwege. Die Glykolyse dient der Gewinnung von Energie durch den schrittweise erfolgenden Abbau von Zucker (Voet *et al*, 2010). Bei der Glykolyse wird Glucose zu Pyruvat oxidiert und dabei reduziertes NADH und ATP gebildet. Eine Übersicht der beteiligten Reaktionen und Enzyme ist in Abbildung 2 dargestellt (Muirhead & Watson, 1992).

Die Mehrzahl der glykolytischen Reaktionen kann auch in entgegengesetzter Richtung ablaufen und dient dann der Herstellung von Zucker (Gluconeogenese). Ausschließlich in glykolytischer Richtung arbeiten die Enzyme Phosphofructokinase (PFK) und die Pyruvatkinase. Bei der Gluconeogenese wird die PFK durch die Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) ersetzt, während Phosphoenolpyruvat ausgehend von Pyruvat über Oxalacetat gebildet wird (Voet *et al*, 2010). Diese Reaktionen werden von den Enzymen Pyruvatcarboxylase und Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK) katalysiert.

Die Glykolyse und Gluconeogenese sind eng verknüpft mit dem zellulären Bedarf an Reduktionsäquivalenten und an ATP. Dabei gilt die PFK als Schlüsselenzym und unterliegt einer komplexen allosterischen Regulation durch ATP, welches sowohl als Substrat als auch in einer zweiten Bindestelle als Inhibitor dient (Schirmer & Evans, 1990). Dem inhibitorischen Effekt von ATP wirken ADP, AMP und in vielen Organismen Fructose-2,6-bisphosphat entgegen (Perutz, 1990).

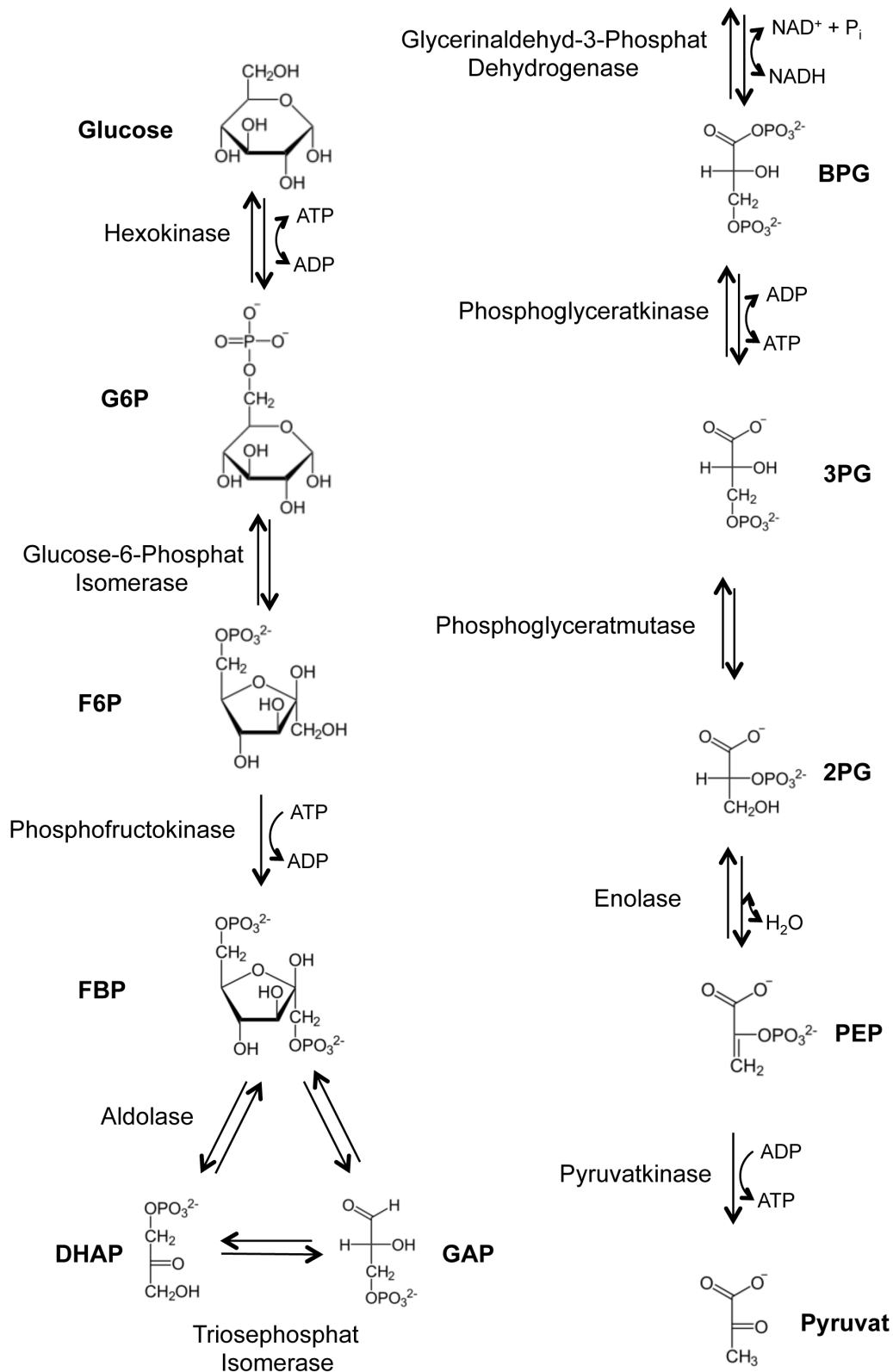


Abbildung 2: Die Glykolyse

Die Abbildung zeigt die Reaktionen im Verlauf der Glykolyse und die zugehörigen Enzyme und Ko-Faktoren. Abkürzungen: G6P = Glucose-6-Phosphat, F6P = Fructose-6-Phosphat, FBP = Fructose-1,6-bisphosphat, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, GAP = Glycerinaldehyd-3-Phosphat, BPG = 1,3-Bisphosphoglycerat, 3PG = 3-Phosphoglycerat, 2PG = 2-Phosphoglycerat, PEP = Phosphoenolpyruvat

Fructose-2,6-bisphosphat wird durch die PFK2 gebildet und inhibiert noch die FBPase. Damit werden die Reaktionen in glykolytische Richtung gelenkt (Okar *et al*, 2001). Direkt reguliert sind darüber hinaus noch die Enzyme Hexokinase und Pyruvatkinase (Voet *et al*, 2010). In Pflanzen ist Phosphoenolpyruvat ein entscheidender Inhibitor der PFK, während Fructose-2,6-bisphosphat keine derartige Funktion hat (Plaxton, 1996).

Des Weiteren unterliegen die beteiligten Enzyme einer komplexen transkriptionellen Regulation ausgelöst durch verschiedene Signale, die sehr spezifisch vom jeweiligen Organismus bzw. Zelltyp abhängen (Desvergne *et al*, 2006; Moore *et al*, 1991; Plaxton, 1996).

In einer Gruppe eukaryotischer Parasiten wurde eine Sonderform der Peroxisomen entdeckt (Michels *et al*, 2006). Diese Parasiten, zu denen Trypanosomen gehören, besitzen sogenannte Glycosomen, in denen sich der überwiegende Teil der glykolytischen Enzyme befindet, die in den meisten anderen Organismen im Zytoplasma lokalisiert sind (Oppendoes & Borst, 1977). Glycosomen sind essentielle Zellbestandteile, in denen die Kompartimentierung der glykolytischen Enzyme eine sogenannte Turbo-Explosion der Glykolyse verhindert, die durch drastische Reduzierung des zellulären ATP-Pools verheerende Auswirkungen für Zellen haben kann (Guerra-Giraldez *et al*, 2002; Haanstra *et al*, 2008).

1.3 *Ustilago maydis*

Die Erforschung der Infektionsmechanismen phytopathogener Mikroorganismen ist bedeutsam, da im Hinblick auf das weltweit stetige Bevölkerungswachstum agrarwirtschaftliche Flächen optimal genutzt und Ernteaufträge durch Schädlinge minimiert werden müssen. Phytopathogene Pilze sind in beträchtlichem Ausmaß an Ernteeinbußen wichtiger Kulturpflanzen beteiligt (Dean *et al*, 2012).

So ist *Magnaporthe oryzae* verantwortlich für die jährlichen Ernteaufträge bei Reispflanzen, die für die Ernährung von etwa 60 Millionen Menschen ausreichen würden (Dean *et al*, 2005; Wilson & Talbot, 2009). Im Gegensatz zu *M. oryzae* ist der Basidiomycet *U. maydis* agrarwirtschaftlich betrachtet ein harmloser Pflanzenschädling. Trotzdem ist der Pilz als Modell für Pflanzenschädlinge etabliert worden, vor allem weil er genetisch gut zugänglich ist und zu einer großen, für die Forschung weit weniger zugänglichen Gruppe von Pathogenen, den Brand- und Rostpilzen, gehört (Brefort *et al*, 2009). Brand- und Rostpilze sind zumeist intrazelluläre, biotrophe Parasiten, die auf lebendes Gewebe ihrer Wirtspflanze angewiesen sind (Martinez-Espinoza *et al*, 2002; Mendgen & Hahn, 2002).

1.3.1 Der Lebenszyklus von *U. maydis* ist mit seiner pathogenen Entwicklung verknüpft

Der biotrophe Basidiomycet *U. maydis* ist der Erreger des Maisbeulenbrands, der auf seiner Wirtspflanze die Bildung von Tumoren induziert, in denen schwarz gefärbte Teliosporen heranreifen (Christensen, 1963; Abb. 3). Diese Teliosporen erwecken bei infizierten Teilen der Maispflanzen den Anschein von Verbrennungen, was ursächlich für die Namensgebung des Pathogens und der Krankheit war (lat. *ustilare* = verbrennen).

Die Auskeimung der Sporen geht mit der Meiose einher und führt zur Ausbildung haploider Zellen (Sporidien), die sich saprophytisch ernähren und hefeartig teilen (Abb. 4). Für den Übergang in die pathogene Phase ist die Fusion zweier kompatibler Sporidien mit unterschiedlichem Paarungstyp Voraussetzung (Bowman, 1946; Rowell & DeVay, 1954).



Abbildung 3: *U. maydis* induzierte Tumoren

Die Abbildung zeigt reife Tumoren an Maispflanzen (Fotos mit freundlicher Genehmigung von Annette Freitag)

U. maydis besitzt zwei unterschiedliche Paarungstyploci. (Banuett & Herskowitz, 1989; Holliday, 1961; Puhalla, 1970). Der biallelische *a*-Locus codiert für ein Pheromon/Rezeptorsystem und ist notwendig für die Fusion von haploiden Zellen, die im Zellzyklus arretieren, als Konjugationshyphen entlang eines Pheromongradienten aufeinander zuwachsen und schließlich an ihren Spitzen fusionieren (Bölker *et al*, 1992; García-Muse *et al*, 2003, Snetselaar & Mims, 1992; Snetselaar, 1993; Spellig *et al*, 1994; Abb. 4).

Nach der Fusion wird die weitere pathogene Entwicklung maßgeblich vom multiallelischen *b*-Locus determiniert, der für zwei Homeodomänen-Transkriptionsfaktoren (*bE* und *bW*) codiert, die bei unterschiedlichem Paarungstyp Heterodimere ausbilden und damit die

Bildung eines dikaryotischen Filaments ermöglichen (Day *et al*, 1971; Gillissen *et al*, 1992; Kämper *et al*, 1995; Puhalla, 1970; Schulz *et al*, 1990).

Im dikaryotischen Filament bilden sich regelmäßige Septen aus, die den mit Zytoplasma gefüllten Spitzenbereich von leeren Segmenten abtrennen und relevant für die effiziente Penetration der Wirtspflanze sind (Banuett & Herskowitz, 1994; Freitag *et al*, 2011; Abb. 4). Der Zellzyklus ist in diesem Entwicklungsstadium in der G2-Phase arretiert (Snetselaar & Mims, 1992; Mielnichuk *et al*, 2009). Auf der Blattoberfläche nimmt der Pilz Hydrophobizität wahr und differenziert an der Spitze des Filaments ein Appressorium als Infektionsstruktur aus, mit der er die Oberfläche penetriert (Lanver *et al*, 2010; Mendoza-Mendoza *et al*, 2009; Snetselaar & Mims, 1992; Abb. 4).

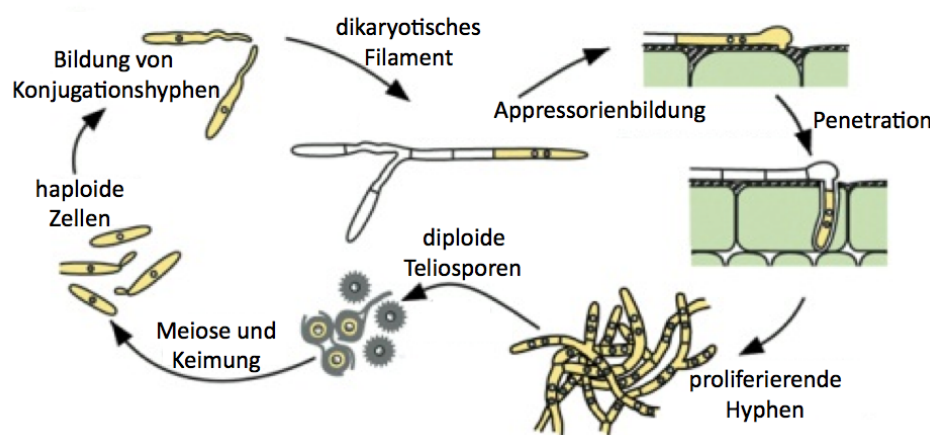


Abbildung 4: Der Lebenszyklus von *Ustilago maydis*

In der schematischen Darstellung sind Illustrationen der verschiedenen Phasen während der Entwicklung von *U. maydis* zu sehen. Nähere Informationen zu den einzelnen Phasen sind im Text zu finden (verändert nach Kämper *et al*, 2006).

Nach erfolgreicher Penetration wird der Zellzyklusarrest wieder aufgehoben und der Pilz beginnt in der Pflanze durch mitotische Teilungen als dikaryotische Hyphe zu proliferieren (Snetselaar & Mims, 1993; Abb. 4). Bei den mitotischen Teilungen werden Schnallen gebildet, die für die Verteilung der Kerne benötigt werden und von dem b-regulierten Protein Clp1 abhängig sind (Scherer *et al*, 2006). Clp1 ist außerdem entscheidend für die Wiederaufnahme des Zellzyklus, indem es *b* negativ reguliert (Heimel *et al*, 2010). Für die Etablierung der biotrophen Interaktion zwischen *U. maydis* und seiner Wirtspflanze ist es für den Pilz unerlässlich, Effektoren zu sezernieren, die gezielt die Immunantwort und den Stoffwechsel der Pflanze verändern (Djamei *et al*, 2011; Djamei & Kahmann, 2012; Doehleemann *et al*, 2009). Die Gene für diese Effektoren sind häufig in Genclustern organisiert (Kämper *et al*, 2006).

Nach etwa vier Tagen erfolgt unter Gewächshausbedingungen die Induktion von Tumoren, die mit einer erheblichen Vergrößerung der pflanzlichen Zellen einhergeht (Doehlemann *et al.*, 2008; Snetselaar & Mims, 1994). In diesen Tumoren akkumuliert Pilzmaterial, es kommt zur Karyogamie und anschließend zur Bildung diploider Teliosporen (Banuett & Herskowitz, 1996). Diese können dann durch Regen, Wind oder Tiere verbreitet werden, bevor der Lebenszyklus von neuem beginnt (Christensen, 1963).

1.3.2 *U. maydis* als Modellorganismus für die Molekular- und Zellbiologie

Neben den Untersuchungen zur pathogenen Entwicklung dient *U. maydis* schon seit geraumer Zeit dem Studium grundlegender biologischer Fragestellungen. Der Pilz eignet sich für derartige Untersuchungen aufgrund seiner Zugänglichkeit für genetische bzw. revers genetische Ansätze, seiner kurzen Verdopplungszeit von etwa zwei Stunden und der Entschlüsselung seines Genoms (Kämper *et al.*, 2006).

Schon lange vor der Sequenzierung von Genomen wurde der Pilz für Studien von Rekombination und DNA-Reparatur verwendet (Holliday, 2004). Viele mechanistische Einsichten zu diesen Themen wurden mithilfe von *U. maydis* generiert, z. B. die erstmalige Identifizierung eines Homologs des bakteriellen Rekombinationsproteins RecA in Eukaryoten (Holloman *et al.*, 2008). Außerdem codiert der Basidiomycet *U. maydis* im Gegensatz zu vielen Ascomyceten für ein Homolog von BRCA2 („breast cancer susceptibility gene“), das die Interaktion von RAD51 mit einzelsträngiger DNA koordiniert (Holloman, 2011).

Neben der Nutzung von *U. maydis* als Forschungsobjekt für die Untersuchungen der DNA-Reparatur wurde der Pilz in den letzten Jahren vermehrt für die Erforschung unterschiedlicher biologischer Fragestellungen verwendet. So eignet sich *U. maydis* zum Beispiel für die Charakterisierung von Langstreckentransport, da sich b-abhängige Hyphen in axenischer Kultur mithilfe von induzierbaren Promotoren einfach erzeugen lassen (Brachmann *et al.*, 2001; Steinberg & Perez-Martin, 2008).

U. maydis ist wie eine ganze Reihe anderer Pilze in der Lage, unterschiedliche Sekundärmetaboliten zu produzieren (Bölker *et al.*, 2008). Es konnten bereits zwei „Gencluster“ charakterisiert werden, die für Enzyme codieren, welche für die Synthese von Varianten der beiden extracellulären Glykolipide Ustilaginsäure (UA) und Mannosylerythritollipid (MEL) verantwortlich sind (Hewald *et al.*, 2005, 2006; Teichmann *et al.*, 2007).

1.4 Fragestellung

Bei der Charakterisierung von PolyA-Signalen in *U. maydis* fiel auf, dass das Gen für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) neben der normalen zytoplasmatischen Isoform noch für eine alternative Isoform mit PTS1-Motiv codiert, die durch differentielles Spleißen und alternative Polyadenylierung gebildet wird. Die Charakterisierung der peroxisomalen Isoform der GAPDH stand danach im Vordergrund dieser Arbeit. Dafür sollte sowohl die Lokalisation und die biologische Funktion dieser GAPDH Isoform untersucht werden. Außerdem war ein Ziel dieser Arbeit, peroxisomale Varianten weiterer glykolytischer Enzyme zu identifizieren und festzustellen, ob glykolytische Enzyme auch in anderen Organismen Isoformen mit PTS1-Motiv besitzen. Die Charakterisierung peroxisomaler Proteine sollte zudem auf Proteine von *U. maydis* ausgedehnt werden, die keinen direkten Zusammenhang mit der Glykolyse haben. Ferner sollten die Funktionen der Peroxisomen in *U. maydis* genauer untersucht werden.

2 Ergebnisse

2.1 Die Untersuchung von PolyA-Signalen in *U. maydis* führte zur Identifizierung alternativer Transkript-Varianten für die GAPDH

2.1.1 Etablierung eines Testsystems zur Untersuchung von PolyA-Signalen in *U. maydis*

Da die Insertion heterologer Gene in das Genom von *U. maydis* häufig zu einer vorzeitigen Polyadenylierung im offenen Leserahmen führt, stellte sich zu Beginn dieser Arbeit die

Frage, welche Signale in *U. maydis* Polyadenylierung auslösen (Ladendorf *et al.*, 2003; Zarnack *et al.*, 2006). Weder bei der Analyse von *U. maydis* Transkripten noch bei einer bioinformatischen Suche im *U. maydis* Genom konnten bisher deutlich angereicherte Motive am 3'Ende von Genen entdeckt werden, die als PolyA-Signale dienen könnten (Doyle *et al.*, 2011; J. Freitag & M. Bölker, nicht publiziert). Diese Untersuchungen weisen auf eine hohe Redundanz derartiger Signale in *U. maydis* hin und könnten somit die vorzeitige Polyadenylierung von Transkripten heterologer Gene erklären. Um diese Hypothese experimentell zu bestätigen, sollte ein Testsystem zur Charakterisierung der PolyA-Signale von *U. maydis* entwickelt werden. Zu diesem Zweck wurde ein experimenteller Ansatz konzipiert, dessen Funktionsweise auf einem konservierten Kontrollmechanismus beruht. Eukaryotische Zellen nutzen Introns oder besonders lange Sequenzen hinter einem offenen Leserahmen (ORF), um fehlerhafte Transkripte mit „nonsense“-Mutationen bei der Translation zu erkennen und abzubauen (nonsense mediated decay (NMD); Stalder & Mühlemann, 2008). Endet ein Gen mit einer solchen destabilisierenden Sequenz, sollte die Einführung eines funktionellen polyA-Signals zu einer deutlichen Stabilisierung der entstehenden mRNA führen (Abb. 5a und 5c). Um den Mechanismus des NMD in einem Testsystem zur Untersuchung von potentiellen PolyA-Signalen zu benutzen, wurde das grün fluoreszierende Protein (GFP) als Reporter verwendet (Tsien, 1998).

Zur Umsetzung dieses Systems wurde ein Intron aus dem *U. maydis* Gen *rac1* (*um00074* aus MIPS *Ustilago maydis* Data Base) siebzig Nukleotide stromabwärts des ORFs von *gfp* in einen Vektor inseriert, der die konstitutive Expression von GFP unter Kontrolle des *otef*-Promotors erlaubt (Spellig *et al.*, 1996). Es konnte bereits gezeigt werden, dass in anderen Systemen der Abstand zwischen dem letzten Intron und dem vorzeitigen Stopcodon mindestens fünfzig Nukleotide betragen muss, um NMD auszulösen und ein Transkript effektiv zu destabilisieren (Nagy & Maquat, 1998). In einem zweiten Ansatz wurde der ca. 3,3 kb lange Leserahmen von *cdc24* (*um02422*) hinter das Stopcodon von *gfp* kloniert.

Beide Konstrukte wurden in den *ip*-Locus des *U. maydis* Stamms Bub8 integriert und auf ihre Expression hin untersucht (Schulz *et al.*, 1990). Dieser Wildtypstamm dient auch als Hintergrund für die meisten nachfolgenden Experimente. Der *ip*-Locus („iron-sulfur protein“; *sdh2*: *um00844*) erlaubt eine ortsspezifische Integration von DNA. Dabei wird eine mutierte Version der Succinatdehydrogenase (*ip^R*) eingeführt, die dem Pilz Resistenz gegen das Fungizid Carboxin verleiht (Broomfield & Hargreaves, 1992).

Sowohl die Insertion des Introns als auch die der langen Sequenz aus *cdc24* führte zu einer deutlichen Reduzierung des GFP-Signals im Vergleich zu einem Kontrollstamm, der *gfp* ohne

Destabilisierungssequenz enthielt (Abb. 5a). Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen in Kombination mit quantitativer „realtime“ PCR (qRT-PCR) zeigten, dass durch die lange Sequenz die Expression von GFP drastischer verringert wurde als durch das Intron (Abb. 5a und b). Folglich wurde das Plasmid mit der langen Sequenz stromabwärts von *gfp* zur Untersuchung von polyA-Motiven verwendet.

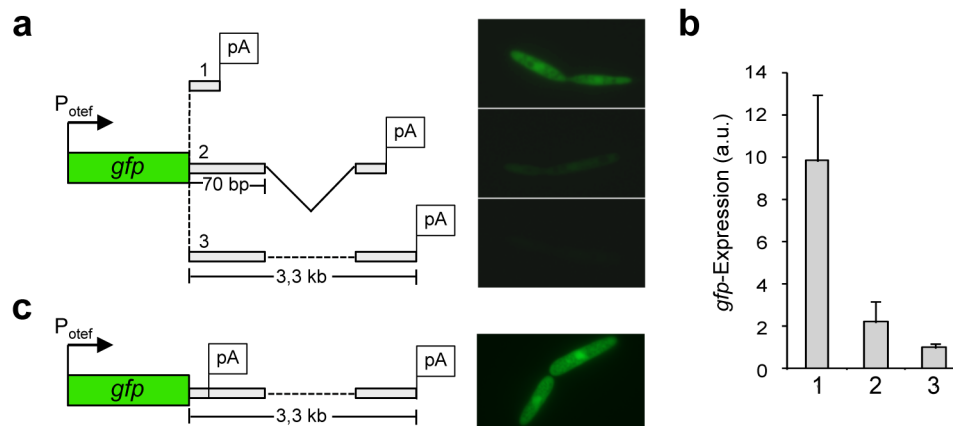


Abbildung 5: Testsystem zur Charakterisierung von polyA-Signalen

a; Links sind die drei GFP-Reporterkonstrukte schematisch dargestellt, die sich jeweils in ihrer 3'untranslatierten Region (3'UTR) unterscheiden. Die Stärke der GFP-Expression repräsentativer Transformanten ist rechts gezeigt. Die Fotos von *U. maydis* Zellen sind den Konstrukten in der gleichen Reihe zugeordnet.

b; Die Menge an *gfp*-mRNA wurde mit qRT-PCR ermittelt. Die Nummerierung entspricht der Nummerierung in a. Standardabweichungen ergaben sich aus drei biologischen Replikaten.

c; Der *Nos*-Terminator wurde zwischen den ORF von *gfp* und die destabilisierende 3'UTR inseriert und das resultierende Konstrukt in *U. maydis* transformiert. Die Stärke der GFP-Fluoreszenz kann mit a verglichen werden.

Die Insertion eines funktionellen polyA-Signals zwischen das Stopcodon von *gfp* und die lange destabilisierende Sequenz sollte zum Abbruch der Transkription und zur Bildung eines stabilen Transkripts mit kurzer 3'UTR führen (Abb. 5c). Daher sollte die Stärke des GFP-Signals mit der Effizienz der Polyadenylierung korrelieren. So führte die Insertion des *Nos*-Terminators aus *Agrobacterium tumefaciens* zu einer deutlich gesteigerten GFP-Fluoreszenz (Abb. 5c; Bevan *et al*, 1983). Für den *Nos*-Terminator war bereits bekannt, dass er ein in *U. maydis* funktionelles polyA-Signal beinhaltet (Spellig *et al*, 1996).

2.1.2 Alternative Transkripte von *gapd* entstehen durch differentielles Spleißen und alternative Polyadenylierung in *U. maydis*

Um die mechanistischen Grundlagen vorzeitiger Polyadenylierung heterologer Gene in *U. maydis* zu verstehen, wurde eine Vielzahl von Sequenzen untersucht. Es konnte ein Modell

entwickelt werden, welches den Aufbau und die Erkennung von polyA-Signalen in *U. maydis* deutlich von anderen Organismen wie dem Ascomyceten *S. cerevisiae* abgrenzt (Johannes Freitag & Torsten Stehlik, unveröffentlichte Daten).

Während der Charakterisierung von polyA-Signalen aus *U. maydis* wurde eine überraschende Beobachtung gemacht, die zu der zentralen Fragestellung dieser Arbeit führte. Das Gen *gapd* (*um02491*) aus *U. maydis*, das für das glykolytische Enzym GAPDH codiert, enthält zwei polyA-Signale und ein Intron direkt am Ende des codierenden Bereichs (Abb. 6a). Durch eine Kombination von alternativem Spleißen und alternativer Polyadenylierung werden drei verschiedene Transkripte gebildet (Abb. 6a).

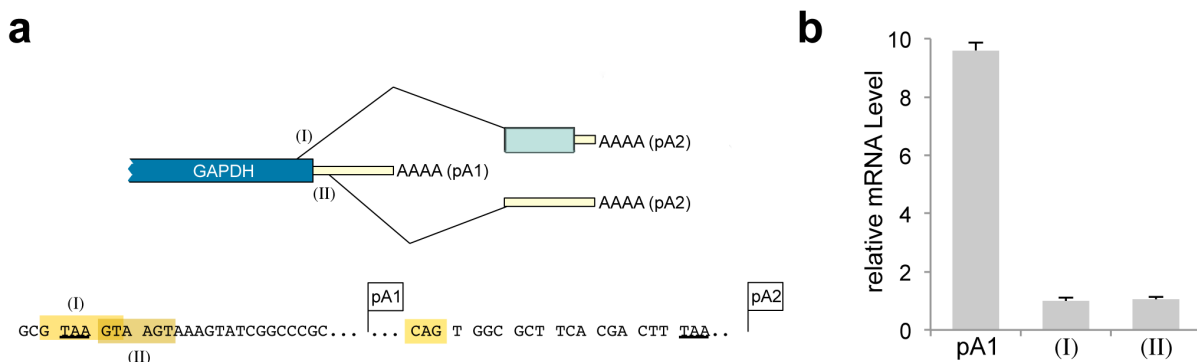


Abbildung 6: Alternative Transkripte von *gapd* aus *U. maydis*

a, Das Schema zeigt das für die GAPDH codierende Gen *gapd* aus *U. maydis*. (I) und (II) weisen auf alternative Spleißstellen hin. (pA1) und (pA2) symbolisieren polyA-Stellen. Durch das Spleißen an Position (I) entsteht ein verlängerter in Hellblau hervorgehobener Leserahmen. Im unteren Teil ist der relevante Bereich für die Prozessierung im Detail dargestellt. Spleißstellen sind unterlegt und Stopcodons sind unterstrichen.

b, Das Diagramm enthält die Ergebnisse von qRT-PCR Experimenten. Fehlerbalken ergaben sich aus der Standardabweichung von drei biologischen Replikaten.

Die nachfolgende Analyse von cDNA-Daten (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>) ergab, dass die Mehrheit der Transkripte im Intron polyadenyliert und deshalb nicht gespleißt wird, während durch differentielles Spleißen zwei unterschiedliche Versionen gebildet werden können, die an der zweiten Polyadenylierungsstelle enden (Abb. 7).

Das Verhältnis der drei Isoformen wurde mit einer qRT-PCR genau bestimmt. Es zeigte sich, dass etwa 80% der *gapd* Transkripte durch eine Polyadenylierung im Intron entstanden sind und nur jeweils ungefähr 10% der Transkripte den beiden Spleißvarianten entsprachen (Abb. 6b). Das für die GAPDH codierende Transkript wird in *U. maydis* also tatsächlich alternativ gespleißt und polyadenyliert.

2.2 Versteckte Varianten der glykolytischen Enzyme GAPDH und PGK enthalten Zielsteuerungssequenzen für Peroxisomen in *U. maydis*

2.2.1 Alternatives Spleißen führt zur Bildung einer peroxisomalen Isoform von GAPDH

Da alternatives Spleißen in Pilzen ungewöhnlich ist und es sich bei der GAPDH um ein entscheidendes Enzym des zentralen Stoffwechsels handelt, wurden die drei unterschiedlichen GAPDH codierenden mRNA-Isoformen genauer untersucht.

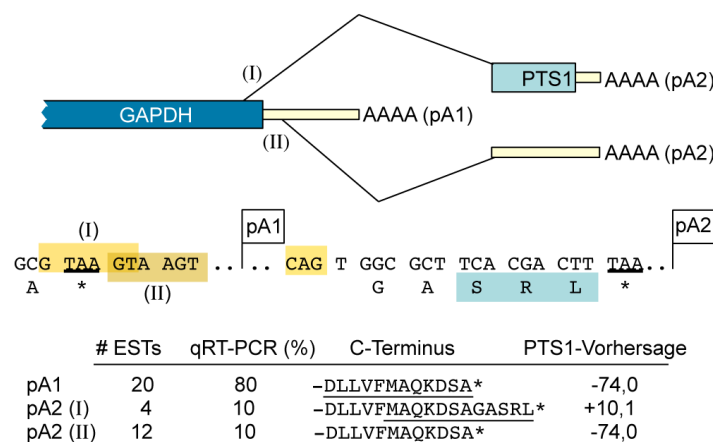


Abbildung 7: *U. maydis* codiert für eine Isoform der GAPDH mit PTS1

Oben ist ein Schema des *gapd* Gens von *U. maydis* dargestellt. Spleißstellen sind mit (I) und (II) bezeichnet. pA1 bzw. pA2 markiert die Position der polyA-Signale. Der charakteristische Anteil des PTS1-Motivs ist in hellblau hervorgehoben. In der Mitte ist der Bereich mit Relevanz für alternative Prozessierung detaillierter gezeigt. Spleißstellen sind unterlegt und Stopcodons unterstrichen. Die Tabelle gibt Auskunft über die Expressionsdaten und die unterschiedlichen C-Termini der einzelnen Isoformen. EST steht für „expressed sequence tag“. Der Wert für die PTS1-Vorhersage wurde mit dem Programm PTS1-Predictor ermittelt.

Es fiel auf, dass eine der gespleißten Varianten für ein am C-Terminus um fünf Aminosäuren verlängertes Protein codiert (Abb. 7). Diese verlängerte Isoform endet auf die Peptidsequenz Serin-Arginin-Leucin (SRL), die stark an das prototypische PTS1-Motiv Serin-Lysin-Leucin (SKL) erinnert (Gould *et al*, 1989). Einen ersten Hinweis darauf, dass es sich bei dieser verlängerten Version tatsächlich um ein peroxisomales Protein handelt, lieferte eine bioinformatische Vorhersage. Mithilfe des Programms PTS1-Predictor kann prognostiziert werden, ob eine C-terminale Sequenz ein PTS1-Motiv beinhaltet (Neuberger *et al*, 2003a, 2003b). Die zu überprüfende Sequenz wird hierfür mit einer Reihe bekannter peroxisomaler bzw. nicht peroxisomaler Proteine unterschiedlicher Organismen verglichen. Aus diesem Vergleich ergibt sich ein Wert, der die Wahrscheinlichkeit beschreibt, mit der eine Test-Sequenz ein funktionelles PTS1-Motiv beinhaltet. Ein positiver Wert spricht für eine

peroxisomale Lokalisierung, während ein deutlich negativer Wert die Funktion einer Sequenz als PTS1 unwahrscheinlich macht. Da zwar die Funktion einer Peptidsequenz als PTS1 maßgeblich von den letzten drei Aminosäuren am C-Terminus determiniert ist, jedoch auch von deren Kontext noch beeinflusst werden kann, werden für diese Analyse die letzten zwölf Aminosäuren miteinbezogen (Brocard & Hartig, 2006; Neuberger *et al*, 2003a, 2003b). Für die längere GAPDH-Isoform wurde ein Wert von 10,1 erhalten, der auf eine peroxisomale Lokalisierung dieses Proteins hinweist. Der kürzeren Isoform wurde ein negativer Wert zugeordnet, der eine peroxisomale Lokalisation entsprechend unwahrscheinlich macht (Abb. 7).

Um diese Vorhersage auch experimentell zu überprüfen, sollte die subzelluläre Lokalisierung der GAPDH-Isoformen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden GFP an die zytoplasmatische bzw. die peroxisomale GAPDH-Isoform (GFP-GAPDH_{cyt} und GFP-GAPDH_{pex}) fusioniert. Außerdem wurde *gfp* an *gapd* mit natürlicher 3'UTR fusioniert (GFP-GAPDH). So können zytoplasmatische und peroxisomale Isoformen in einer Zelle mit GFP markiert sein und damit indirekt alternatives Spleißen nachgewiesen werden. Die resultierenden Plasmide wurden in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert. Alle diese Varianten wurden unter Kontrolle des *otef*-Promotors exprimiert.

Sowohl GFP-GAPDH als auch GFP-GAPDH_{cyt} lagen im Zytoplasma diffus verteilt vor (Abb. 8a). GFP-GAPDH_{pex} befand sich hingegen zum Teil in punktförmigen Strukturen, in denen auch das rot fluoreszierende Fusionsprotein mCherry („monomeric Cherry“) mit C-terminalem SKL-Motiv (mCherry-SKL) akkumulierte (Abb. 8a; Shaner *et al*, 2004). mCherry-SKL war auch in den gleichen Strukturen zu beobachten wie die peroxisomale Thioesterase (Pte1; Um00334) aus *U. maydis*, für die eine peroxisomale Lokalisation aus der Bäckerhefe bereits bekannt war (Abb. 8b; Jones *et al*, 1999).

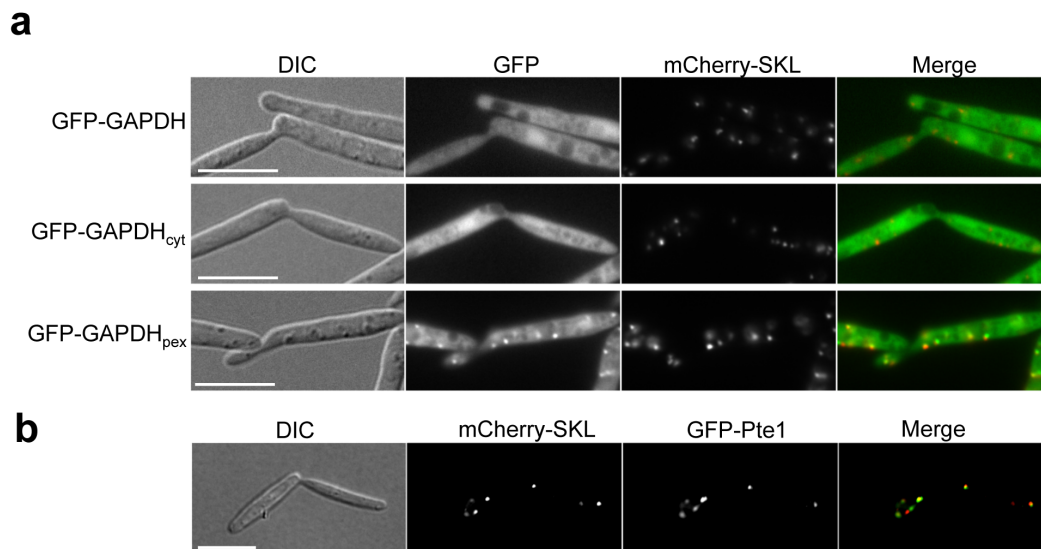


Abbildung 8: Die verlängerte Isoform der GAPDH lokalisiert in den Peroxisomen von *U. maydis*

a; Die Lokalisation der drei angegebenen GFP-GAPDH Fusionsproteine wurde in Zellen untersucht, die zusätzlich das peroxisomale Markerprotein mCherry-SKL enthielten.

b; Es sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines *U. maydis* Stamms gezeigt, der sowohl mCherry-SKL als auch GFP-Pte1 exprimiert.

a und b; Im „Merge“ ist eine Überlagerung des roten und des grünen Kanals zu sehen. Der Größenstandard entspricht 10 μm .

Alle diese Ergebnisse zeigen, dass in *U. maydis* neben der zytoplasmatischen GAPDH eine zusätzliche peroxisomale Isoform der GAPDH gebildet wird. Diese peroxisomale Fraktion wird vermutlich bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von GFP-GAPDH Stämmen von der zytoplasmatischen Fraktion überlagert und ist dann erkennbar, wenn nur die gespleißte Isoform mit PTS1 an GFP fusioniert war.

2.2.2 Das Überlesen des Stopcodons führt zur Bildung einer peroxisomalen PGK Isoform

Die überraschende Lokalisierung einer Isoform des glykolytischen Enzyms GAPDH in den Peroxisomen von *U. maydis* war der Anlass für die Suche nach weiteren glykolytischen Enzymen mit versteckten PTS1-Motiven. Auch bei intensiver Betrachtung der entsprechenden Gene wurden keine weiteren Anzeichen für die Bildung peroxisomaler Isoformen durch alternatives Spleißen entdeckt.

Allerdings fiel auf, dass das Überlesen des Stopcodons von *pgk1* (*um04871*) bei der Translation zur Synthese eines verlängerten Proteins führt, das auf Prolin-Lysin-Leucin (PKL) endet und laut Vorhersage in Peroxisomen lokalisiert (Abb. 9). *pgk1* codiert für die

Phosphoglyceratkinase (PGK), die den Schritt nach der GAPDH bei der Glykolyse katalysiert (Abb. 2).

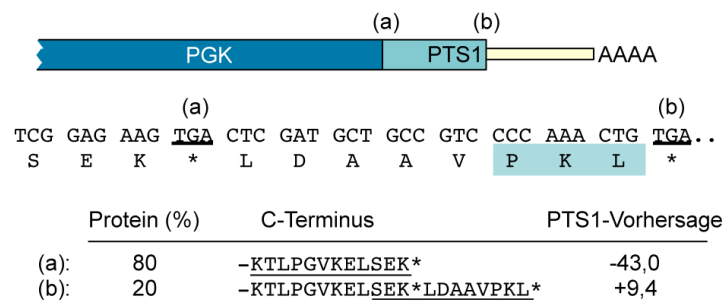


Abbildung 9: Durch Überlesen des ersten Stopcodons entsteht eine Variante der PGK mit PTS1

Oben ist schematisch das *pgk1* Gen aus *U. maydis* dargestellt. (a) und (b) zeigen die Position von Stopcodons an. Das PTS1-Motiv ist hellblau unterlegt. Der detailliertere Ausschnitt in der Mitte verdeutlicht das Zustandekommen einer verlängerten Isoform mit PTS1 durch Überlesen des ersten Stopcodons (unterstrichen). Der charakteristische Anteil des PTS1-Motivs ist hellblau unterlegt. Die untere Tabelle gibt Auskunft über das Verhältnis der beiden Isoformen (siehe Abschnitt 2.2.3) und die zugehörige PTS1-Vorhersage.

In Analogie zu den vorhergehenden Experimenten wurden verschiedene PGK Isoformen an GFP fusioniert und in *U. maydis* exprimiert. Das *pgk1*-Gen wurde dabei sowohl inklusive als auch exklusive der Sequenz nach dem Stopcodon an *gfp* fusioniert (GFP-PGK bzw. GFP-PGK_{cyt}). Fehlt der Bereich direkt hinter dem Stopcodon, kann keine verlängerte Isoform mit PTS1 erzeugt werden. Außerdem wurde ein Plasmid hergestellt, das eine mutierte Variante von *pgk1* fusioniert an *gfp* enthält, in der das erste Stopcodon TGA durch das Serincodon TCA ersetzt wurde, so dass die verlängerte Version konstitutiv entsteht (GFP-PGK_{pex}).

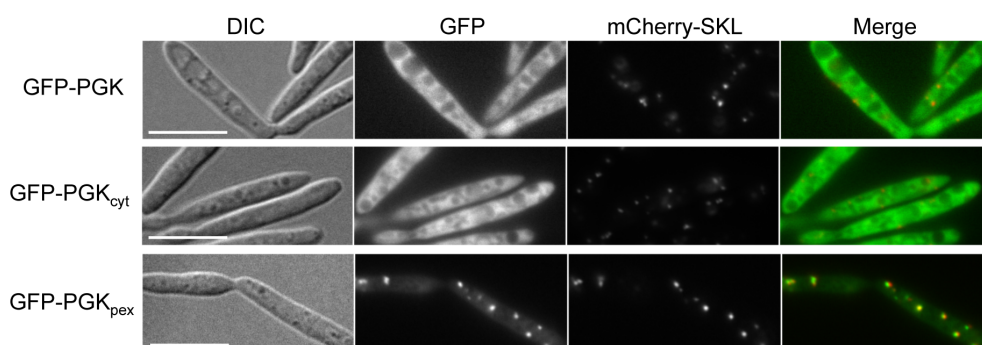


Abbildung 10: Eine Isoform der PGK lokalisiert in den Peroxisomen von *U. maydis*

Die Lokalisation der drei angegebenen GFP-PGK Fusionsproteine wurde in einem Stamm untersucht, der das peroxisomale Markerprotein mCherry-SKL enthielt. Im „Merge“ ist eine Überlagerung des roten und des grünen Kanals zu sehen. Der Größenstandard entspricht 10 µm.

Während GFP-PGK und GFP-PGK_{cyt} im Zytoplasma verteilt vorlagen, befand sich das Fusionsprotein GFP-PGK_{pex} größtenteils in den Peroxisomen und lokalisierte eindeutig zusammen mit mCherry-SKL (Abb. 10). Demnach entsteht durch das Überlesen des ersten Stopcodons eine peroxisomale Isoform der PGK. Allerdings konnte mit diesen Experimenten noch nicht gezeigt werden, ob und in welchem Ausmaß dieses Stopcodon tatsächlich überlesen wird.

2.2.3 Das Überlesen des Stopcodons erzeugt einen erheblichen Anteil peroxisomaler PGK

Um den Anteil peroxisomaler PGK bestimmen zu können, wurden Plasmide hergestellt, die eine Unterscheidung zwischen normaler Termination der Translation und dem Überlesen des Stopcodons ermöglichen. Zunächst wurde eine GFP-Fusion erzeugt, bei der *gfp* drei Nukleotide hinter das Stopcodon von *pgk1* fusioniert wurde (PGK•GFP1). Es konnte in anderen Systemen gezeigt werden, dass der Sequenzkontext TGA (Stopcodon) gefolgt von einem Cytosin entscheidend zum Überlesen dieses Stopcodons beiträgt (Abb. 11a; Bertram *et al.*, 2001).

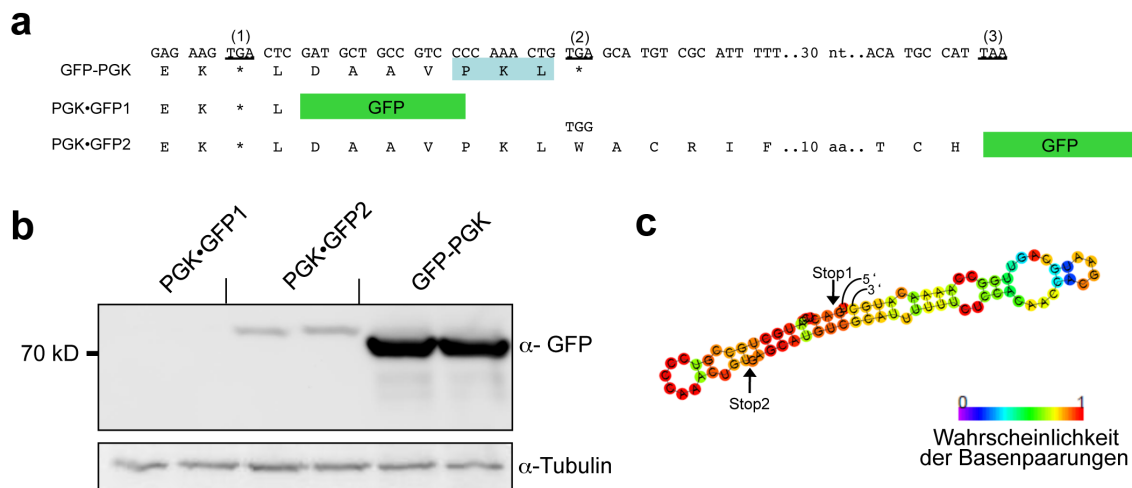


Abbildung 11: Durch das Überlesen des ersten Stopcodons entsteht eine peroxisomale Isoform der PGK

a; Die Abbildung zeigt die DNA- und Proteinsequenzen im 3'-Bereich des *pgk1* Gens aus *U. maydis*. (1)-(3) weisen auf Stopcodons (unterstrichen) im Leserahmen hin. Die Position von GFP in Konstrukten, die dem Nachweis der verlängerten Isoform dienen, ist angezeigt.

b; Aus zwei biologischen Replikaten von *U. maydis* Stämmen, die die jeweiligen GFP-Fusionsproteine enthielten, wurde Gesamtprotein präpariert und GFP-Fusionsproteine mithilfe eines Western Blot nachgewiesen. Tubulin diente der Mengenkontrolle.

c; Die dargestellte RNA-Struktur wurde mit RNA-Fold bestimmt und könnte sich im Bereich der beiden angezeigten Stopcodons bilden (Gruber *et al.*, 2008).

Der Nachweis von PGK•GFP1 erfolgte mithilfe von Western Blot Analysen. Als Kontrolle wurde ein Stamm verwendet, der das Fusionsprotein GFP-PGK exprimiert (Abb. 11a). Die Proteinmenge ist direkt vergleichbar, da es sich in beiden Fällen um eine einfache Integration in den *ip*-Locus handelte.

Allerdings konnte das Überlesen des Stopcodons im Western Blot nicht detektiert werden (Abb. 11b). Deshalb wurde ein weiteres GFP-Fusionskonstrukt generiert, in dem *gfp* 84 Nukleotide stromabwärts auf das erste Stopcodon von *pgk1* folgt (Abb. 11a; PGK•GFP2). Die vorhergesagte Sekundärstruktur dieses Bereichs könnte die Voraussetzung für die verlängerte PGK Isoform mit PTS1 sein (Bertram *et al.* 2001; Abb. 11c). Um mit diesem Konstrukt GFP im Western Blot sichtbar machen zu können, wurde das Stopcodon hinter dem PTS1 durch ein Tryptophan-Codon ersetzt (Abb. 11a). In Western Blot Analysen konnte ein Fusionsprotein nachgewiesen werden, das einen Anteil von etwa 5% der gesamten Menge an PGK ausmacht und durch das Überlesen des ersten Stopcodons entstanden sein muss (Abb. 11b).

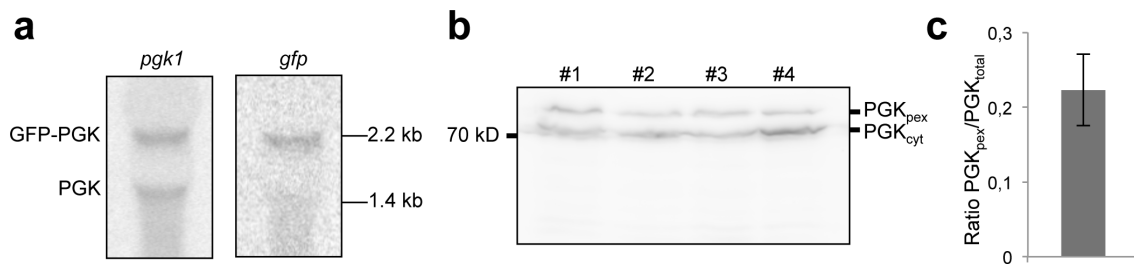


Abbildung 12: Nachweis beider PGK Isoformen unter endogenen Expressionsbedingungen

a; Gesamt-RNA wurde mithilfe eines Northern Blots auf die Expression von *pgk1* Transkripten hin untersucht. Die obere Bande zeigt die Menge an Transkripten, die für GFP-PGK^{TRP} codieren. Die untere Bande zeigt die Transkripte, die für die endogene PGK codieren. Als Sonden wurden die ORF-Sequenzen von *pgk1* und *gfp* verwendet.

b; Gesamtprotein wurde aus 4 Stämmen präpariert (#1- #4), die *gfp-pgk1^{TRP}* unter Kontrolle des endogen *pgk1*-Promotors exprimierten. Die zytoplasmatischen und peroxisomalen Isoformen der PGK wurde mit einem Western Blot nachgewiesen.

c; Quantifizierung der peroxisomalen PGK Isoform. Der Fehlerbalken ergab sich aus der Standardabweichung aus drei biologischen Replikaten.

Um eine gleichzeitige Detektion von normaler Termination und dem Überlesen des ersten Stopcodons zu ermöglichen, wurde GFP an den N-Terminus der PGK fusioniert und das zweite Stopcodon wiederum durch das Tryptophan-Codon TGG substituiert (GFP-PGK^{TRP}). Dadurch entstehen zwei GFP-PGK Isoformen mit einem Größenunterschied von ungefähr 3 kD, die entweder durch normale Termination oder durch das Überlesen des Stopcodons gebildet werden. Die Expression *gfp-pgk^{TRP}* erfolgte unter Kontrolle des endogenen Promotors, um eine mögliche Überexpression auszuschließen.

Anschließend wurde sowohl die Menge an mRNA als auch die Menge von GFP-Fusionsproteinen untersucht. Die Menge an gebildeter *gfp-pgk^{TRP}* mRNA stimmte in etwa mit der Menge endogener *pgk1* mRNA überein (Abb. 12a). Western Blot Analysen und deren Quantifizierung zeigten, dass unter diesen Bedingungen die verlängerte Isoform sogar einen Anteil von ungefähr 20% der Gesamtmenge von GFP-PGK^{TRP} ausmachte (Abb. 12b und 12c). Demzufolge liegt in *U. maydis* ein signifikanter Anteil der PGK als verlängertes Protein mit funktionellem PTS1 vor. Für die Synthese dieser Variante wird das Stopcodon in erheblichem Ausmaß überlesen.

2.3 Peroxisomale Isoformen von GAPDH und PGK sind in vielen Pilzen weit verbreitet

Die Entdeckung kryptischer peroxisomaler Isoformen zweier Schlüsselenzyme der Glykolyse in *U. maydis* wirft die Frage auf, ob es sich dabei um ein *U. maydis* spezifisches Phänomen handelt oder ob sich auch in anderen Pilzen Mechanismen finden, durch die peroxisomale Varianten von GAPDH und PGK erzeugt werden können. Eine detaillierte Analyse öffentlich zugänglicher Sequenzdaten zeigte, dass in einer Vielzahl von Pilzen durch das Überlesen von Stopcodons bzw. durch alternatives Spleißen Varianten beider Enzyme gebildet werden können, die auf PTS1-Motive enden (Abb. 13). Dabei finden sich Hinweise auf kryptische peroxisomale Isoformen von GAPDH und PGK sowohl in vielen Ascomyceten als auch in vielen Basidiomyceten (Abb. 13). Die Mechanismen zur Erzeugung der peroxisomalen Varianten sind interessanterweise für die beiden Enzyme nicht konserviert. Zwar finden sich alternatives Spleißen und das gezielte Überlesen zur Erzeugung von PTS1-Motiven in Ascomyceten und in Basidiomyceten. Jedoch werden in Ascomyceten peroxisomale Isoformen der PGK durch alternatives Spleißen erzeugt, während in Basidiomyceten und dem ursprünglichen Zygomyceten *Phycomyces blakesleeenanus* das Überlesen des Stopcodons zur Bildung einer peroxisomalen PGK führen kann. Für die Erzeugung peroxisomaler GAPDH Varianten ist die Situation noch variabler (Abb. 13). Auffällig ist, dass mit der Ausnahme des Basidiomyceten *Laccaria bicolor* in den untersuchten Organismen immer jeweils zwei unterschiedliche Mechanismen zur Erzeugung der PTS1-Motive von GAPDH bzw. PGK verantwortlich sind. Im Stammbaum sind nur diejenigen Organismen aufgeführt, deren PTS1-Motive auch experimentell überprüft wurden (Abb. 13). Um die vorhergesagten PTS1-Motive *in vivo* zu untersuchen, wurde in Zusammenarbeit mit Julia Ast ein Reportergerätsansatz

entwickelt. Da die letzten zwölf Aminosäuren eines Proteins die Effizienz eines PTS1-Motivs determinieren, wurden Konstrukte für fluoreszierende Proteine hergestellt, an deren Ende die zwölf C-terminalen Aminosäuren der jeweiligen GAPDH oder PGK Varianten fusioniert waren.

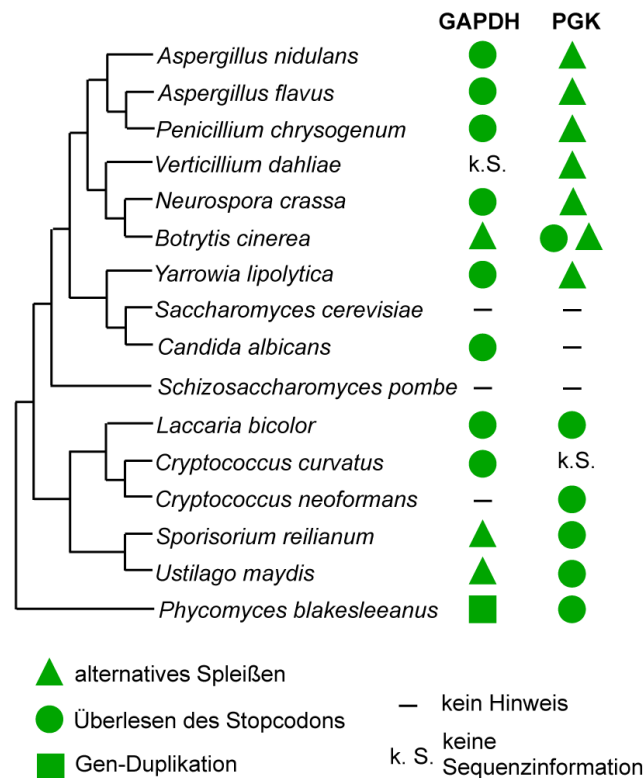


Abbildung 13: Peroxisomale Isoformen von GAPDH und PGK sind in Pilzen weit verbreitet

Der phylogenetische Baum veranschaulicht die weite Verbreitung posttranskriptioneller Mechanismen zur Erzeugung peroxisomaler Isoformen von GAPDH und PGK. Die Bedeutung der Symbole geht aus der Legende hervor. Alle vorhergesagten PTS1-Motive konnten zumindest bei heterologer Expression den peroxisomalen Import fluoreszierender Proteine vermitteln.

Diese Konstrukte wurden in den *S. cerevisiae* Stamm S288c eingebracht und die Lokalisierung der gebildeten Fusionsproteine bestimmt (Mortimer & Johnston, 1986; Euroscarf). Als Referenz für Peroxisomen diente die 2,4-Dienoylreduktase Sps19 (www.yeastgenome.org: YNL202W; Gurvitz *et al.* 1997). Diese Daten inklusive der zugehörigen PTS1-Vorhersagen und Sequenzen sind im Anhang gezeigt (Abb. A1 und A2).

Kryptische PTS1-Motive in GAPDH und PGK Isoformen sind also nicht auf *U. maydis* beschränkt, sondern finden sich in einer Vielzahl von Pilzen, was auf eine wichtige biologische Funktion glykolytischer Enzyme in Peroxisomen hinweist, die wahrscheinlich unabhängig von einer bestimmten Lebensweise ist. Bemerkenswert ist, dass in den beiden gut charakterisierten Modellorganismen *S. cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* bislang keinerlei Anzeichen für eine peroxisomale Lokalisation glykolytischer Enzyme entdeckt werden konnte.

2.3.1 Peroxisomale Isoformen von GAPDH und PGK aus *A. nidulans*

Im vorigen Kapitel wurde beschrieben, dass peroxisomale Isoformen von GAPDH und PGK für viele Pilze vorhergesagt werden können und die entstehenden PTS1-Motive auch funktionell sind. Am Beispiel des filamentösen Ascomyceten *A. nidulans* wurde daher überprüft, ob diese Isoformen in Ascomyceten auch gebildet werden.

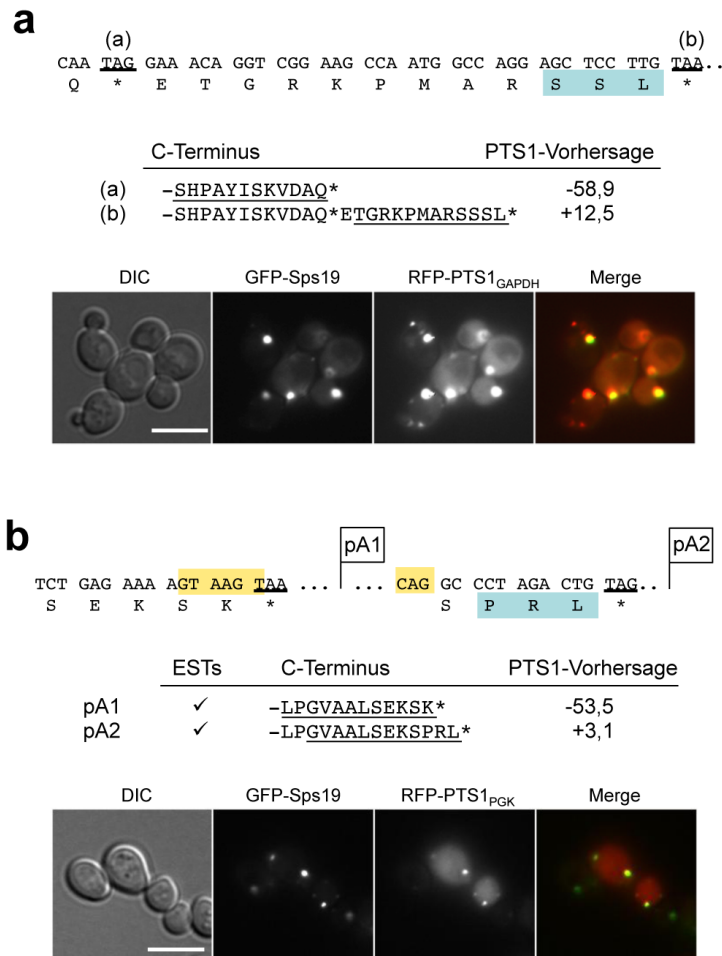


Abbildung 14: Peroxisomale Varianten von GAPDH und PGK in *A. nidulans*

a; Oben sind DNA-Sequenz und Proteinsequenz der GAPDH aus *A. nidulans* dargestellt. (a) und (b) zeigen die Position der Stopcodons an. Die mittlere Tabelle gibt Auskunft über die C-Termini beider Isoformen und den zugehörigen PTS1-Vorhersagen.

b; Oben sind DNA-Sequenz und Proteinsequenz der PGK aus *A. nidulans* dargestellt. Spleißstellen sind unterlegt und Stopcodons unterstrichen. pA1 und pA2 zeigen PolyA-Stellen an. Die mittlere Tabelle gibt Auskunft über die C-Termini beider Isoformen und den zugehörigen PTS1-Vorhersagen. ESTs für beide Varianten wurden erzeugt und sequenziert.

a und b; Der charakteristische Anteil der PTS1-Motive ist in hellblau unterlegt. Stämme die RFP fusioniert an die PTS1-Motive von GAPDH oder PGK enthielten, wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Als Referenz für Peroxisomen diente GFP-Sps19. Der Längenstandard beträgt 5 µm.

Im Gegensatz zu *U. maydis* zeigt *A. nidulans* Anzeichen von alternativem Spleißen zur Erzeugung der peroxisomalen Variante der PGK, während im Fall der GAPDH das Überlesen

des Stopcodons zur Ausbildung eines PTS1-Motivs führt (Abb. 14a und b; www.aspgd.org: AN1264 bzw. AN8041). Die C-terminalen zwölf Aminosäuren, die für beide Enzyme eine positive PTS1-Vorhersage aufweisen, wurden als Fusion mit dem rot fluoreszierenden Protein (RFP) in der Bäckerhefe daraufhin untersucht, ob sie peroxisomalen Import vermitteln (Shaner *et al.*, 2004). Beide RFP-Fusionsproteine befanden sich vornehmlich in Peroxisomen (Abb. 14a und b).

Anschließend wurde überprüft, ob auch in *A. nidulans* die vorhergesagte peroxisomale PGK Isoform tatsächlich gebildet werden kann. Daher wurde eine PCR durchgeführt in der cDNA aus *A. nidulans* als Matrize diente. Bei der Sequenzierung von resultierenden ESTs konnten Sequenzen von gespleißten *pgkA* Transkripten identifiziert werden, die für die peroxisomale Isoform codieren. Damit konnte auch für den Ascomyceten *A. nidulans* gezeigt werden, dass durch alternatives Spleißen eine peroxisomale Isoform der PGK hergestellt wird.

2.3.2 Hinweise auf peroxisomale Varianten von GAPDH und PGK in EST-Banken

Sowohl aus *U. maydis* als auch aus *A. nidulans* konnten Transkripte isoliert werden, die für glykolytische Enzyme mit PTS1-Motiven codieren. Daraufhin wurde untersucht, ob sich in EST-Banken weitere Hinweise für das Vorhandensein peroxisomaler Isoformen von GAPDH und PGK finden lassen (Abb. 15).

Bei der Analyse von ESTs des GAPDH codierenden Gens, die in dem Rostpilz *Puccinia graminis-tritici* generiert wurden, wurde ein abgewandelter Spleißmechanismus entdeckt, der der Erzeugung eines PTS1 codierenden Transkripts dient (Abb. 15). In *P. graminis-tritici* führt die Verwendung alternativer 3'-Spleißstellen zur Bildung von zwei unterschiedlichen Transkripten (Abb. 15).

In *Aspergillus terreus* wird eine peroxisomale Isoform der PGK, vergleichbar mit *A. nidulans*, durch alternative Polyadenylierung und differentielles Spleißen erzeugt. Hinweise für die Bildung dieser Isoform fanden sich ebenfalls in EST-Daten (Abb. 15). Auch für zwei weitere Pilze wurden cDNA Sequenzen gefunden, die Rückschlüsse auf versteckte PTS1-Motive in glykolytischen Enzymen erlauben (Freitag *et al.*, 2012).

Die Analyse der veröffentlichten Sequenzdaten liefert eine zusätzliche Bestätigung dafür, dass in vielen Pilzen nicht nur Hinweise für das Vorhandensein der GAPDH und der PGK in Peroxisomen existieren, sondern die peroxisomalen Isoformen wirklich in signifikantem Ausmaß exprimiert werden.

Puccinia graminis-tritici: GAPDH (PTG_04956.2)

AAG CGG GAG TGA GT CAG T GCT TAG T GGG AAG CCC AAG CTA TAA
 K R D A *
 G K P K L *

	ESTs (#)	C-Terminus	PTS1-Vorhersage
(I):	5	-VDLVCEMAKRDA*	-55,6
(II):	1	-VDLVCEMAKRDKPKL*	+4,3

Aspergillus terreus: PGK (Gen: 4354973)

TCA AGT AAG TAA ... TAG TG ACG GGA TCT AAA CTG TGA...
 S S K * M T G S K L *

	ESTs (#)	C-Terminus	PTS1-Vorhersage
(pA1):	33	-KELPGVTALSSK*	-17,9
(pA2):	2	-KELPGVTALSMTGSKL*	+5,8

Abbildung 15: Hinweise für alternative Isoformen von GAPDH und PGK in EST-Daten

Oben: DNA- und Proteinsequenzen im 3'-Bereich des GAPDH codierenden Gens aus *P. graminis-tritici*. Alternative 3'-Spleißstellen sind mit (I) und (II) beschriftet. Das charakteristische Ende des PTS1-Motivs und die Spleißstellen sind in der Detailansicht hervorgehoben. In der Tabelle sind die Anzahl der identifizierten ESTs beider Isoformen und die zugehörigen PTS1-Vorhersagen zu sehen. Unten: DNA- und Proteinsequenzen im hinteren Bereich des GAPDH codierenden Gens aus *A. terreus*. Die Isoformen entstehen hier durch Spleißen und Polyadenylierung am zweiten polyA-Signal (pA2) bzw. durch Polyadenylierung im Intron (pA1). Der Rest der Abbildung entspricht dem oberen Teil. Die Identifikationsnummern der Gene sind von JGI (www.jgi.doe.gov/) bzw. NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Dies stärkt die Annahme, dass sich auch diejenigen Versionen für die das Überlesen eines Stopcodons notwendig ist, gebildet werden. Die Identifizierung solcher Isoformen ist allerdings ungleich schwieriger, weil im Gegensatz zu cDNA Daten keine entsprechenden Daten von Peptidfragmenten aus Proteomstudien öffentlich zugänglich sind.

2.3.3 PGK aus *Botrytis cinerea*: Ein Hinweis auf die Evolution der Mechanismen zur Generierung der PTS1-Motive in glykolytischen Enzymen

Während in Basidiomyceten peroxisomale Varianten von PGK durch das Überlesen des ersten Stopcodons entstehen können, werden sie in den untersuchten Ascomyceten durch alternative Prozessierung der zugehörigen mRNA generiert. Interessanterweise weist das PGK codierende Gen des Pflanzenschädling *B. cinerea* Anzeichen für beide Mechanismen auf (Abb. 16; www.broadinstitute.org: BC1G_12890.1). In *B. cinerea* können sowohl durch differentielles Spleißen als auch durch das Überlesen des Stopcodons Isoformen mit PTS1-Motiv gebildet werden (Abb. 16). Beide PTS1-Motive waren in der Lage, den peroxisomalen Import eines RFP-Fusionsproteins zu vermitteln (Abb. 16). Dies weist darauf hin, dass das

PGK codierende Gen aus *B. cinerea* einen evolutionären Übergangszustand darstellen könnte. Möglicherweise werden sogar beide Mechanismen in *B. cinerea* zur Herstellung alternativer Isoformen verwendet.

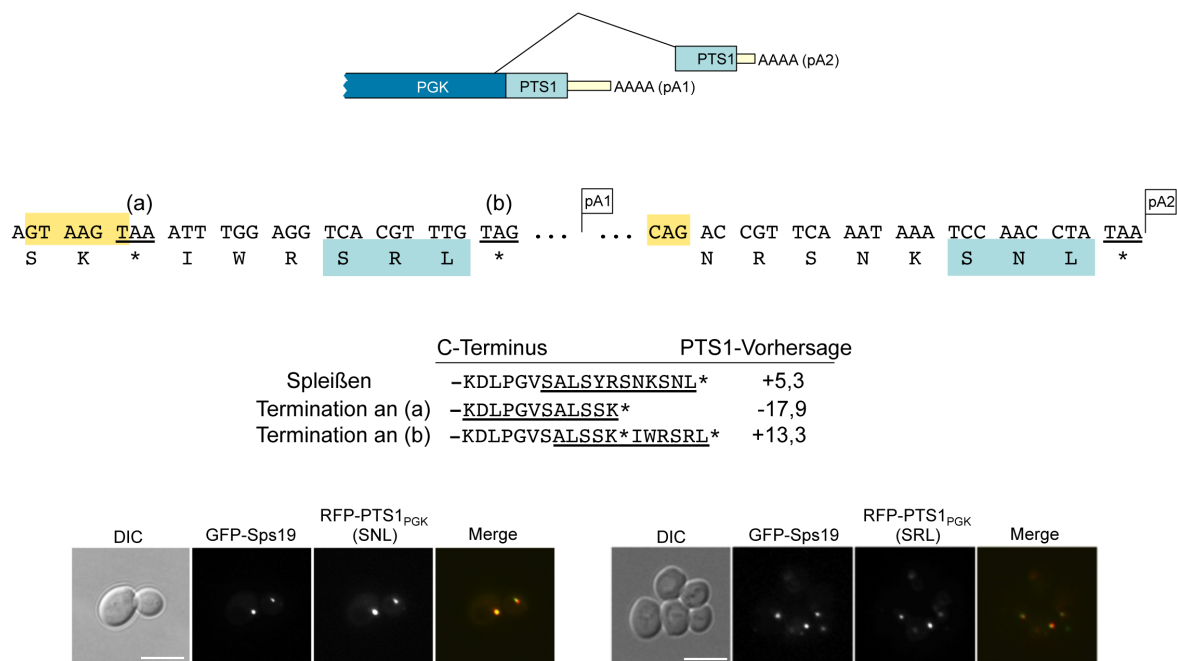


Abbildung 16: Anzeichen für unterschiedliche Mechanismen zur Generierung von PTS1-Motiven ausgehend von einem Gen

Oben ist schematisch das PGK codierende Gen aus *B. cinerea* abgebildet. In der Detailansicht sind Spleißstellen und typische Elemente von PTS1-Motiven hervorgehoben. (a) und (b) bezeichnen Stopcodons. Die Tabelle gibt Aufschluss über die C-Termini der möglichen Isoformen und den zugehörigen PTS1-Vorhersagen. Die 12 C-terminalen Aminosäuren mit positiver PTS1-Vorhersage wurden an RFP fusioniert, in Hefe exprimiert und im Vergleich mit GFP-Sps19 mikroskopisch untersucht. Der „Merge“ zeigt die Überlagerung von rotem und grünem Signal. Der Größenstandard entspricht 5 µm.

2.3.4 *Phycomyces blakesleeanus* besitzt drei paraloge Gene für die GAPDH

Zygomyceten, zu denen auch *P. blakesleeanus* gehört, haben sich schon relativ früh in der Evolution von den restlichen Pilzen getrennt. Daher war es interessant zu untersuchen, ob sich auch in *P. blakesleeanus* Hinweise für verborgene Mechanismen zur Erzeugung von PTS1-Motiven von GAPDH und PGK finden lassen. Die peroxisomale Isoform der PGK von *P. blakesleeanus* entsteht vermutlich durch das Überlesen des ersten Stopcodons (Abb. 13; Abb. A2). Es konnten aber zunächst keine Hinweise für eine kryptische peroxisomale Version der GAPDH gefunden werden. Allerdings war auffällig, dass im Genom von *P. blakesleeanus*

drei paraloge und sehr ähnliche Gene für GAPDH enthalten sind. Diese drei GAPDH-Isoformen weisen jedoch deutliche Unterschiede an ihren C-Termini auf (Abb. 17a).

a

Phycomyces blakesleeanus: GAPDH1 (Protein ID: 40333), PTS1-Vorhersage: -42,1

TTG ATC GTC CAC GCC GCC AAG GTC GAT GGT GCC CTC TAA
L I V H A A K V D G A L *

Phycomyces blakesleeanus: GAPDH2 (Protein ID: 76956), PTS1-Vorhersage: -35,3

CTT TTG GTT CAT GTT GCA AAG GTT GAT GGC AAT CTG TAA
L L V H V A K V D G N L *

Phycomyces blakesleeanus: GAPDH3 (Protein ID: 57879), PTS1-Vorhersage: -59,5

TTG CTT CTT CAC GTC GCA AAG GTT GAT GGC AAC GCC TAA
L L L H V A K V D G N A *

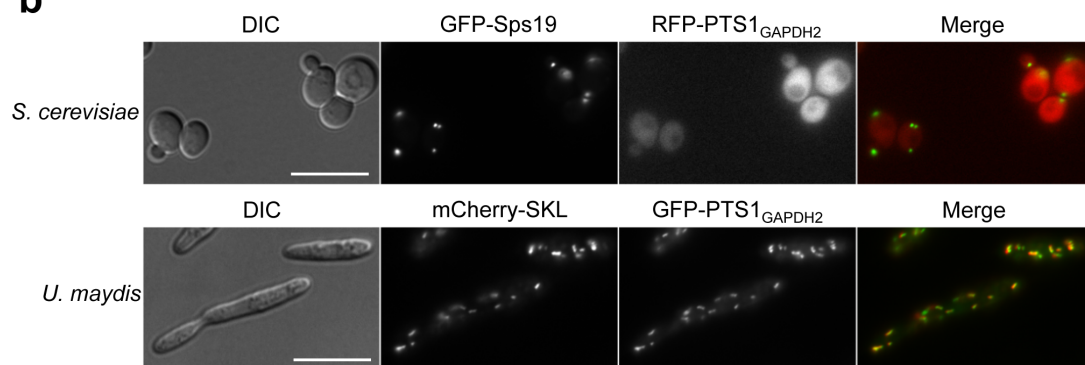
b

Abbildung 17: Eine GAPDH Isoform aus *P. blakesleeanus* mit funktionellem PTS1

a; Vergleichende Darstellung der C-Termini der GAPDH-Paraloge inklusive zugehöriger DNA-Sequenzen codierenden Bereiche aus *P. blakesleeanus*. Die Proteinidentifizierungsnummer (Protein ID) ist von JGI. Die drei letzten Aminosäuren sind hervorgehoben.

b; Die C-terminalen zwölf Aminosäuren von GAPDH2 fusioniert an die angegeben fluoreszierenden Proteine wurden in *S. cerevisiae* bzw. *U. maydis* exprimiert und mikroskopisch untersucht. Als Referenzen für Peroxisomen dienten GFP-Sps19 bzw. mCherry-SKL. Im „Merge“ ist die Überlagerung von rotem und grünem Kanal zu sehen. Der Größenstandard entspricht 10 µm.

Um zu überprüfen, ob eine der drei Isoformen peroxisomal lokalisiert ist, wurden *S. cerevisiae* bzw. *U. maydis* Stämme hergestellt, die die zwölf C-terminalen Aminosäuren der GAPDH-Varianten fusioniert an RFP bzw. GFP exprimieren. Bei mikroskopischen Untersuchungen konnte in *U. maydis* für den C-Terminus von GAPDH2 eine peroxisomale Lokalisierung beobachtet werden (Abb. 17). Erstaunlich war, dass sich das entsprechende RFP-Fusionsprotein in *S. cerevisiae* im Zytoplasma verteilt befand. Die zwölf C-terminalen Aminosäuren der beiden anderen Isoformen (GAPDH1 und GAPDH3) führten weder in *U. maydis* noch in *S. cerevisiae* zu einer peroxisomale Lokalisierung von GFP bzw. RFP (Freitag *et al.* 2012).

Diese Daten weisen darauf hin, dass die Erkennung von PTS1-Motiven in *U. maydis* und der Bäckerhefe unterschiedlich ist. Außerdem erscheint es wahrscheinlich, dass die partielle peroxisomale Lokalisation von GAPDH und PGK schon früh während der Evolution der Pilze entstanden ist und auch durch eine Duplikation von Genen hervorgerufen werden kann.

2.4 Charakterisierung von Peroxinen in *U. maydis*

2.4.1 *U. maydis* codiert für zwei PTS1-Rezeptoren

Die evolutionäre Konservierung peroxisomaler Isoformen von GAPDH und PGK in Pilzen legt eine wichtige biologische Funktion dieser Varianten in den Peroxisomen nahe. Um zunächst eine Idee der generellen Funktion von Peroxisomen in *U. maydis* zu bekommen, wurden drei für Peroxine codierende Gene untersucht, deren Homologe in anderen Organismen bereits charakterisiert waren (siehe z. B. Rucktäschel *et al.*, 2011). Zunächst wurde das Homolog von *pex6* (*um02421*) in den Stämmen Bub8, FB1 (Banuett & Herskowitz, 1989) und SG200 deletiert. *pex6* codiert für eine ATPase, die sowohl in der Bäckerhefe als auch in Menschen notwendig für den Import von Matrixproteinen ist (Rucktäschel *et al.* 2011). SG200 besitzt kompatible *a* und *b* Allele und ist ohne Kreuzungspartner pathogen (Kämper *et al.* 2006).

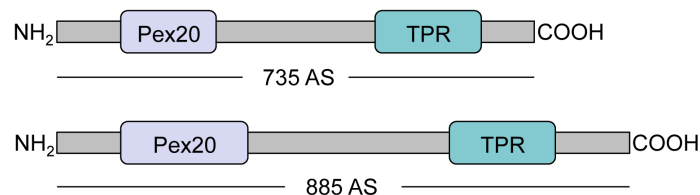


Abb. 18: Domänenarchitektur der beiden Pex5 Homologe aus *U. maydis*

Oben ist Pex5a und unten Pex5b dargestellt. Die charakteristischen TPR-Wiederholungen sind in hellblau hervorgehoben. Regionen mit Ähnlichkeit zu Pex20 sind violett markiert.

Da die peroxisomalen Isoformen von GAPDH und PGK PTS1-Motive aufweisen, war es naheliegend, Mutanten zu erzeugen, in denen der Import von Proteinen mit PTS1 gestört ist. Im Genom von *U. maydis* werden im Gegensatz zu den meisten anderen Pilzen zwei potentielle PTS1-Rezeptoren Pex5a (Um02528) und Pex5b (Um10172) codiert. Beide dieser untereinander sehr ähnlichen Rezeptorproteine zeigen in ihrem N-Terminus noch Ähnlichkeiten zu Pex20 und haben daher möglicherweise eine Aufgabe beim Import von PTS2-Proteinen, für den Pex20 benötigt wird (Abb. 18; Kiel *et al.*, 2006). Ein isoliertes

Homolog von Pex20 konnte in *U. maydis* nicht identifiziert werden (Kiel *et al*, 2006). Diese Domäne tritt bei Pex5 aus der Bäckerhefe nicht auf, findet sich aber in ähnlicher Weise in einer Isoform von Pex5 im humanen System (Kiel *et al*, 2006). Durch homologe Rekombination wurden *pex5a*, *pex5b* und beide Gene gemeinsam in dem haploiden Stamm Bub8 sowie in dem haploid pathogenen Stamm SG200 deletiert.

2.4.2 Peroxisomaler Import von mCherry-SKL in *pex*-Mutanten

Zunächst wurde in den unterschiedlichen Deletionsmutanten die Lokalisierung von mCherry-SKL überprüft, um den peroxisomalen Import von PTS1-Proteinen in Abhängigkeit der drei Peroxine zu untersuchen.

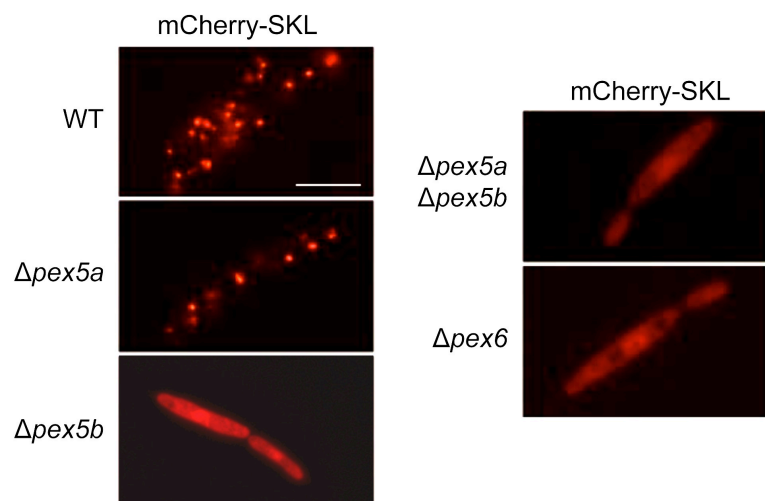


Abbildung 19: Lokalisierung von mCherry-SKL in *pex* Mutanten

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Lokalisierung von mCherry-SKL in unterschiedlichen *pex* Mutanten. Der Größenstandard entspricht 10 μm .

In $\Delta pex5a$ Mutanten lokalisiert mCherry-SKL ausschließlich in den Peroxisomen. In der $\Delta pex5b$ Mutante, der $\Delta pex5a \Delta pex5b$ Doppelmutante und auch in der $\Delta pex6$ Mutante hingegen befand sich das Fusionsprotein im gesamten Zytoplasma verteilt (Abb. 19). Folglich sind Pex6 und Pex5b in *U. maydis* für den Import von Proteinen mit PTS1 notwendig, während Pex5a zumindest für den Import des peroxisomalen Markerproteins mCherry-SKL nicht benötigt wird.

2.4.3 Funktionelle Peroxisomen haben eine Funktion beim Zucker- und beim Fettsäuremetabolismus in *U. maydis*

Peroxisomen sind in vielen Organismen essentiell für den Katabolismus langkettiger Fettsäuren (Poirier *et al*, 2006). Daher wurde das Wachstum der peroxisomalen Mutanten auf Minimalmedium mit Ölsäure ((Z)-9-Octadecensäure) untersucht. Als Kontrolle wurde Minimalmedium mit Glucose verwendet. Sämtliche untersuchten Mutanten waren nicht in der Lage, auf Minimalmedium mit Ölsäure als einziger Kohlenstoffquelle zu proliferieren (Abb. 20).

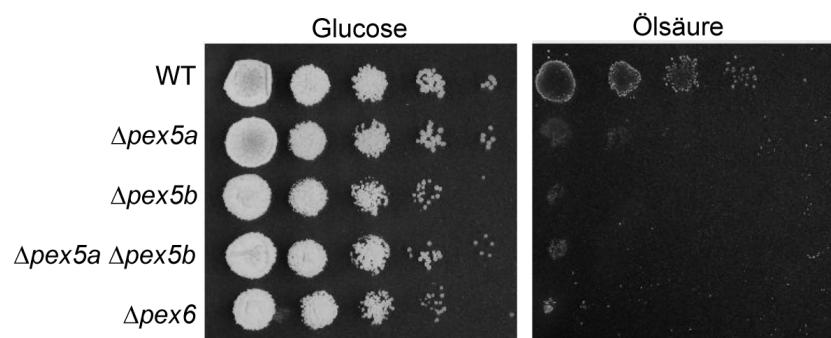


Abbildung 20: Wachstum von *pex* Mutanten auf Glucose und Ölsäure als Kohlenstoffquelle

Serielle Verdünnungen ausgehend von einer optischen Dichte von eins ($OD_{600} = 1$) der verschiedenen Stämme wurden auf Minimalmedium mit den beiden angegebenen Kohlenstoffquellen getropft und 48h bei 28°C inkubiert.

Zusätzlich zu diesem Phänotyp zeigten $\Delta pex5b$, $\Delta pex5a \Delta pex5b$ und $\Delta pex6$ Mutanten noch einen Wachstumsdefekt auf Glucose. Die Koloniegröße war im Vergleich dem Ausgangsstamm Bub8 und mit $\Delta pex5a$ Mutanten deutlich verringert (Abb. 20). Diesen Ergebnissen zufolge haben Peroxisomen in *U. maydis* nicht nur eine Funktion beim Abbau von Fettsäuren, sondern spielen vermutlich auch eine Rolle beim Stoffwechsel von Zucker. Für das Wachstum auf Ölsäure werden sogar beide Pex5 Proteine benötigt, obwohl $\Delta pex5a$ Mutanten mCherry-SKL importieren konnten. $\Delta pex5a$ hat daher wahrscheinlich eine Funktion beim Import anderer für das Wachstum auf Ölsäure benötigter Matrixproteine.

2.4.4 Peroxisomen spielen während der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* eine Rolle

In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Verlust der peroxisomalen β -Oxidation zu einer Reduzierung der Virulenz von *U. maydis* führt (Klose & Kronstad, 2006).

Um zu untersuchen, ob die Abwesenheit funktioneller Peroxisomen die pathogene Entwicklung von *U. maydis* beeinflusst, wurden Infektionsexperimente in Mais durchgeführt. Alle untersuchten Mutanten waren verglichen mit dem Wildtyp SG200 abgeschwächt virulent. Die durch die *U. maydis* Infektion ausgelösten Symptome in Maispflanzen waren in $\Delta pex5b$, $\Delta pex5a\Delta pex5b$ und $\Delta pex6$ Mutanten noch weitaus geringer als in SG200 $\Delta pex5a$ Stämmen (Abb. 21a).

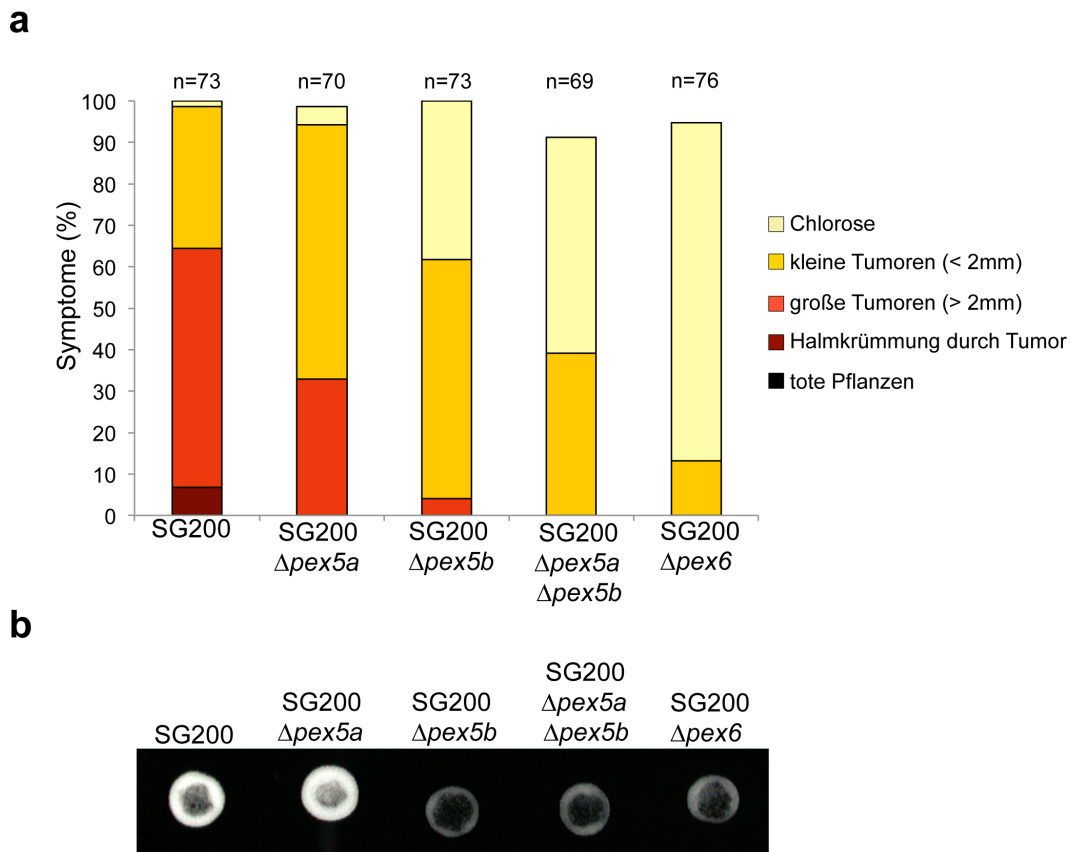


Abbildung 21: Peroxisomen haben eine wichtige Bedeutung bei der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*

a; Sieben Tage alte Maispflanzen wurden mit einem Inokulum von 0,5 ml Kultur ($OD_{600} = 1$) infiziert. Zehn Tage nach der Infektion wurden die Krankheitssymptome ausgewertet. Als Grundlage dieser Auswertung dienten die Kriterien, die in der Legende aufgeführt sind (modifiziert nach Kämper *et al.* 2006). Es wurden drei unabhängige Infektionsexperimente durchgeführt. Die Anzahl der einzelnen Symptome ist in Relation zu Gesamtzahl infizierter Pflanzen dargestellt.

b; Die verschiedenen Mutanten wurden im Vergleich mit dem Wildtyp SG200 auf aktivkohlehaltiges Vollmedium getropft und für 16h bei 28°C inkubiert.

Eine wichtige morphologische Transition bei der pathogenen Entwicklung von *U. maydis* ist die Ausbildung von *b*-induzierten Hyphen auf der Pflanzenoberfläche. Diese entstehen durch Fusion kompatibler haploider Sporidien, werden aber auch in ähnlicher Weise von dem haploid pathogen Stamm SG200 gebildet (Bölker *et al.*, 1995). Auf Aktivkohle haltigem Festmedium kann dieses filamentöse Wachstum mit dem Auge als weißes Myzel wahrgenommen werden (Day & Anagnostakis, 1973).

Zur Überprüfung der Hyphenbildung wurden Zellsuspensionen der peroxisomalen Mutanten und des Wildtypstamms SG200 auf Medium mit Aktivkohle aufgetropft. Die Ausbildung von Filamenten in *SG200Δpex6*, *SG200Δpex5b* und auch in der Doppelmutante war drastisch reduziert, während sich das filamentöse Wachstum von *pex5a* Mutanten nicht deutlich vom Wildtyp unterschied (Abb. 21b). Peroxisomen haben demnach eine wichtige Funktion bei der biotrophen Entwicklung von *U. maydis* und werden vermutlich schon zu Beginn dieser Entwicklung benötigt.

2.5 Die peroxisomalen Isoformen von GAPDH und PGK haben eine Funktion bei der biotrophen Entwicklung von *U. maydis*

Die Abwesenheit funktioneller Peroxisomen führte in *U. maydis* zu Wachstumsdefekten auf Glucose und Ölsäure und zu einer Reduzierung der Virulenz. Daher wurde anschließend untersucht, ob die peroxisomalen Isoformen von GAPDH und PGK ebenfalls während dieser Prozesse benötigt werden.

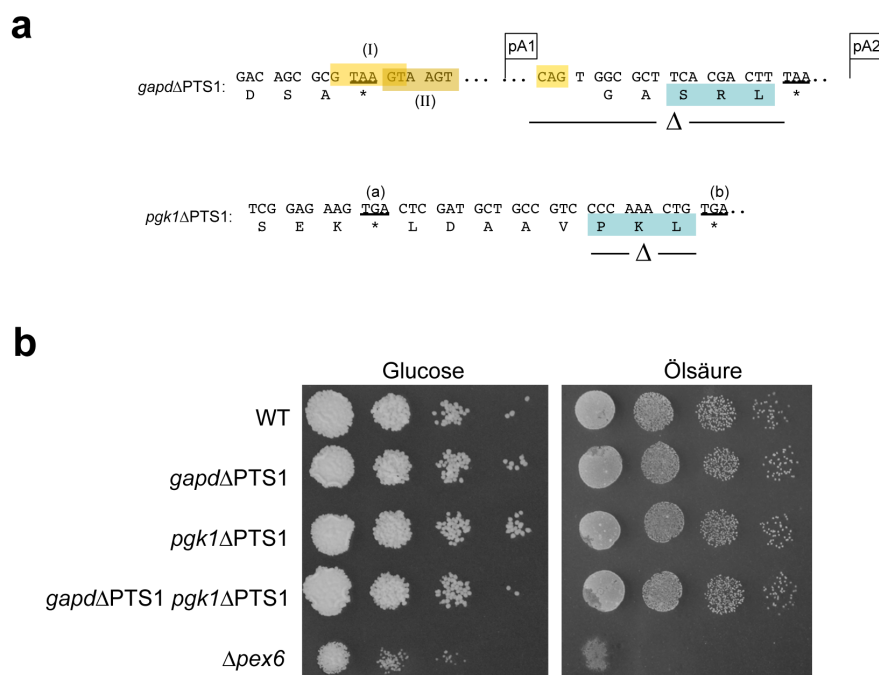


Abbildung 22: Die Abwesenheit der PTS1-Motive von GAPDH und PGK hat keinen Einfluss auf das Wachstum auf Ölsäure und Glucose

a; Schematische Darstellung der Strategie zur Entfernung der PTS1-codierenden Sequenz von *gapd* und *pgk1* am genomischen Locus.

b; Serielle Verdünnungen ausgehend von einer $OD_{600}=0,1$ (links) oder $OD_{600}=1$ (rechts) wurden auf Festmedien mit den angegebenen C-Quellen getropft und für 48 h inkubiert.

Folglich wurde die PTS1 codierende Sequenz von *gapd* und *pgk1* am genomischen Lokus durch homologe Rekombination deletiert (Abb. 22a). Die entsprechenden Mutanten *gapd*ΔPTS1 und *pgk1*ΔPTS können nur noch die zytoplasmatischen Formen dieser beiden Enzyme bilden. Diese Deletionsmutanten wurden zunächst in dem Stamm Bub8 hergestellt und das Wachstum auf Festmedium mit Glucose bzw. Ölsäure überprüft. Das Wachstum auf keiner der beiden Kohlenstoffquellen wurde durch die Entfernung der PTS1-Motive von GAPDH und PGK beeinflusst (Abb. 22b). Auch die gleichzeitige Mutation des für das PTS1-Motiv codierenden Bereichs in beiden Genen führte zu keiner Veränderung (Abb. 22b). Die Anwesenheit peroxisomaler Isoformen von GAPDH und PGK hat also im Gegensatz zur Anwesenheit von intakten Peroxisomen keine entscheidende Bedeutung für das Wachstum unter den getesteten Bedingungen.

Weil peroxisomale Mutanten eine deutlich reduzierte Virulenz aufwiesen, wurde überprüft, ob die peroxisomalen Isoformen von GAPDH und PGK für die biotrophe Interaktion von *U. maydis* mit seiner Wirtspflanze benötigt werden. Daher wurden die für das PTS1-Motiv codierenden Bereiche von *gapd* und *pgk1* auch im FB1 (*alb1*) Hintergrund deletiert. FB1 ist in der Lage, mit dem kompatiblen haploiden Stamm Bub8 (*a2 b4*) zu kreuzen und die vollständige pathogene Entwicklung zu durchlaufen.

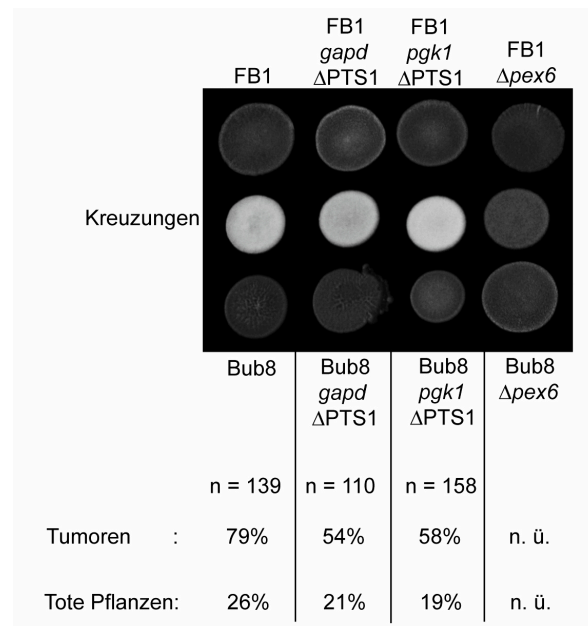


Abbildung 23: Die Abwesenheit von GAPDH und PGK in den Peroxisomen führt zu reduzierter Virulenz

Oben sind Kreuzungstests auf Aktivkohlemedium dargestellt. Kompatible Stämme wurden mit einer OD₆₀₀ = 1 entweder einzeln oder im 1:1 Verhältnis mit dem entsprechenden Kreuzungspartner gemischt auf Aktivkohle-Medium getropft und für 16h bei 28°C. Unten sind Ergebnisse aus Pathogenitätstests zu sehen. Hierfür wurden Zellen einer OD₆₀₀ = 1 in Wasser aufgenommen und die jeweiligen Kreuzungspartner ebenfalls im 1:1 Verhältnis gemischt. Die weitere Durchführung und Auswertung entspricht Abbildung 21. Es wurden allerdings nur Tumoren und tote Pflanzen gezählt. n. ü. = nicht überprüft.

Erste Untersuchungen zeigten, dass *gapd* Δ PTS1 und *pgk1* Δ PTS1 Mutanten eine leicht verringerte Virulenz aufwiesen (Abb. 23). Allerdings war bei *gapd* Δ PTS1 und *pgk1* Δ PTS1 Mutanten im Vergleich zu einer Kreuzung von Wildtypstämmen im Gegensatz zu Δ *pex6* Mutanten keine verringerte Hyphenbildung auf Aktivkohle-Medium zu beobachten (Abb. 23). Die Verwendung des haploiden pathogenen Stamms SG200 erleichtert die Charakterisierung der Virulenz, da bei Infektionen mit diesem Stamm keine Kreuzungspartner benötigt werden (Kämper *et al.*, 2006). Daher wurden *gapd* Δ PTS1 und *pgk1* Δ PTS1 Mutanten auch in diesem genetischen Hintergrund generiert und die entsprechende Doppelmutante erzeugt.

Die Virulenz von SG200*gapd* Δ PTS1, SG200*pgk1* Δ PTS1 und der Doppelmutante SG200*gapd* Δ PTS1*pgk1* Δ PTS1 war im Vergleich mit dem Wildtyp SG200 eindeutig reduziert (Abb. 24). Allerdings war der Phänotyp deutlich weniger ausgeprägt als der einer SG200 Δ *pex6* Mutante. Während SG200 Δ *pex6* Stämme fast keine Tumoren mehr bildeten, war bei den Stämmen, die keine peroxisomalen Isoformen von GAPDH und PGK besitzen, noch sehr häufig die Bildung von Tumoren zu beobachten (Abb. 24).

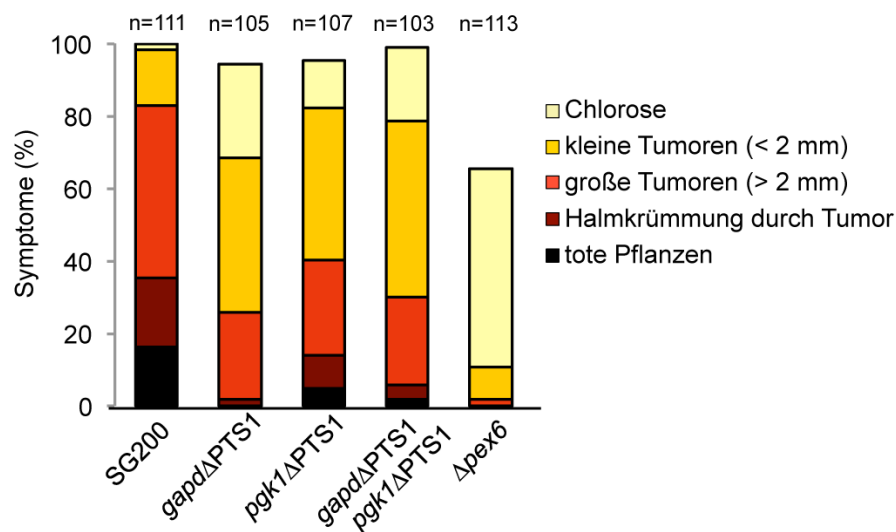


Abbildung 24: Peroxisomale Isoformen von GAPDH und PGK sind für die pathogene Entwicklung von *U. maydis* von Bedeutung

Das Infektionsexperiment wurde analog zu dem in Abbildung 21 dargestellten Experiment durchgeführt und ausgewertet.

Die peroxisomalen Isoformen der glykolytischen Enzyme spielen demzufolge eine Rolle bei der pathogenen Entwicklung von *U. maydis*. Es ist allerdings denkbar, dass diese Isoformen keine spezifische Funktion für die Etablierung der biotrophen Interaktion haben, sondern ein „Fitness“-Nachteil in der komplexen Stresssituation während des Wachstums auf und in der Wirtspflanze diesen Phänotyp hervorruft. Dafür spricht auch, dass peroxisomale Isoformen von GAPDH und PGK in vielen Pilzen mit unterschiedlicher Lebensweise vorkommen.

2.6 Die peroxisomale GAPDH hat überlappende Funktionen mit anderen peroxisomalen NAD abhängigen Dehydrogenasen

Die von der GAPDH und der PGK katalysierten Reaktionen sind beide an die Umsetzung von Co-Substraten gekoppelt. Bei der Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat wird NAD^+ zu NADH reduziert bzw. bei der umgekehrten Reaktion NADH zu NAD^+ oxidiert. Die peroxisomale Membran ist nicht durchlässig für größere Metaboliten wie ATP und NADH, das zum Beispiel bei der β -Oxidation von Fettsäuren entsteht (Rottensteiner & Theodoulou, 2006; Van Roermund *et al.*, 1995). Die Regeneration von NAD^+ erfolgt durch Dehydrogenasen, indem membrangängige oxidierte in membrangängige reduzierte Substrate umgewandelt werden, die dann die Membran passieren können (Shuttle-Mechanismus; Rottensteiner & Theodoulou, 2006). Daher wurde untersucht, ob die peroxisomale GAPDH aus *U. maydis* ein Teil eines ähnlichen Shuttle-Mechanismus ist.

2.6.1 Peroxisomale NAD abhängige Dehydrogenasen in *U. maydis*

Es gibt Hinweise dafür, dass in verschiedenen Organismen mehrere NAD abhängige Dehydrogenasen an der Redoxhomöostase in Peroxisomen beteiligt sind (Antonenkova & Hiltunen, 2012). Um die Hypothese zu überprüfen, dass die peroxisomale GAPDH Isoform auch daran beteiligt ist, wurden zunächst andere peroxisomale Dehydrogenasen aus *U. maydis* genauer untersucht, die ebenfalls NAD als Co-Faktor haben und überlappende Funktionen mit der peroxisomalen Isoform der GAPDH haben könnten.

Im Genom von *U. maydis* sind eine NAD abhängige Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase (Gpd1: Um00555) und eine NAD abhängige Malatdehydrogenase (Mdh1: Um11161) codiert, die beide vermutlich im Peroxisom lokalisiert sind, da sie PTS1-Motive aufweisen (Abb. 25). Um die peroxisomale Lokalisation von Gpd1 zu untersuchen, wurde der ORF von *gpd1* an das 3'Ende von *gfp* fusioniert und unter Kontrolle des *otef*-Promotors in *U. maydis* exprimiert. Um das PTS1-Motiv von Mdh1 zu überprüfen, wurde die Nukleotidsequenz, die für die letzten zwölf Aminosäuren von Mdh1 codiert, an *gfp* angehängt und ebenfalls unter Kontrolle des *otef*-Promotors in *U. maydis* exprimiert.

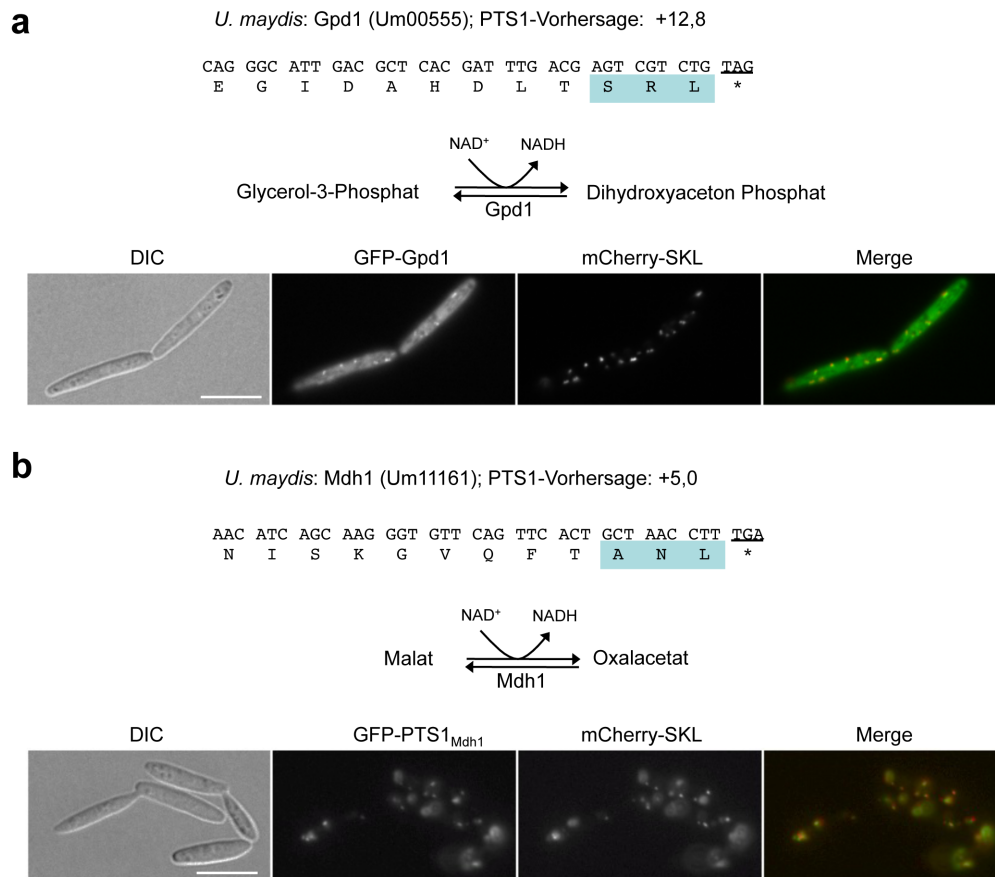


Abbildung 25: Peroxisomale Lokalisation von Gpd1 und Mdh1 in *U. maydis*

a; Oben sind die DNA-Sequenz und das C-terminale PTS1-Motiv von Gpd1 in *U. maydis* dargestellt. Der charakteristische Anteil des PTS1 ist hervorgehoben und der Wert für die PTS1-Vorhersage angegeben. Die von Gpd1 katalysierte Redox-Reaktion ist darunter gezeigt.

b; Der Aufbau der Abbildung entspricht a.

a und b; Die Lokalisation der angegebenen Fusionsproteine wurde mikroskopisch in *U. maydis* untersucht. Die Ko-Lokalisation der GFP-Fusionsproteine mit mCherry-SKL ist im „Merge“ zu sehen. Der Größenstandard entspricht 10 μm .

Beide GFP-Fusionsproteine befanden sich gemeinsam mit mCherry-SKL in den Peroxisomen. Im Fall von Gpd1 war relativ viel zytoplasmatischer Hintergrund zu beobachten. Es handelt sich demzufolge vermutlich um ein Enzym mit dualer Lokalisierung. Beide Enzyme könnten also in *U. maydis* an der peroxisomalen Redox-Homöostase beteiligt sein und beispielsweise NAD^+ während der Oxidation von Fettsäuren regenerieren.

2.6.2 Überlappende Funktionen der peroxisomalen NAD abhängigen Dehydrogenasen

Da sowohl Mdh1, Gpd1 und GAPDH Reaktionen katalysieren können, die NADH bzw. NAD^+ zur Verfügung stellen, wurden auch von Mdh1 und Gpd1 Mutanten hergestellt, die

nicht mehr im Peroxisom lokalisieren können (*mdh1* Δ PTS1 und *gpd1* Δ PTS1). Außerdem wurden diese Mutationen auch im *gapd* Δ PTS1 Hintergrund generiert und eine entsprechende Dreifachmutante erzeugt. Zunächst wurde das Wachstum dieser Mutanten auf Minimalmedium mit Glucose überprüft.

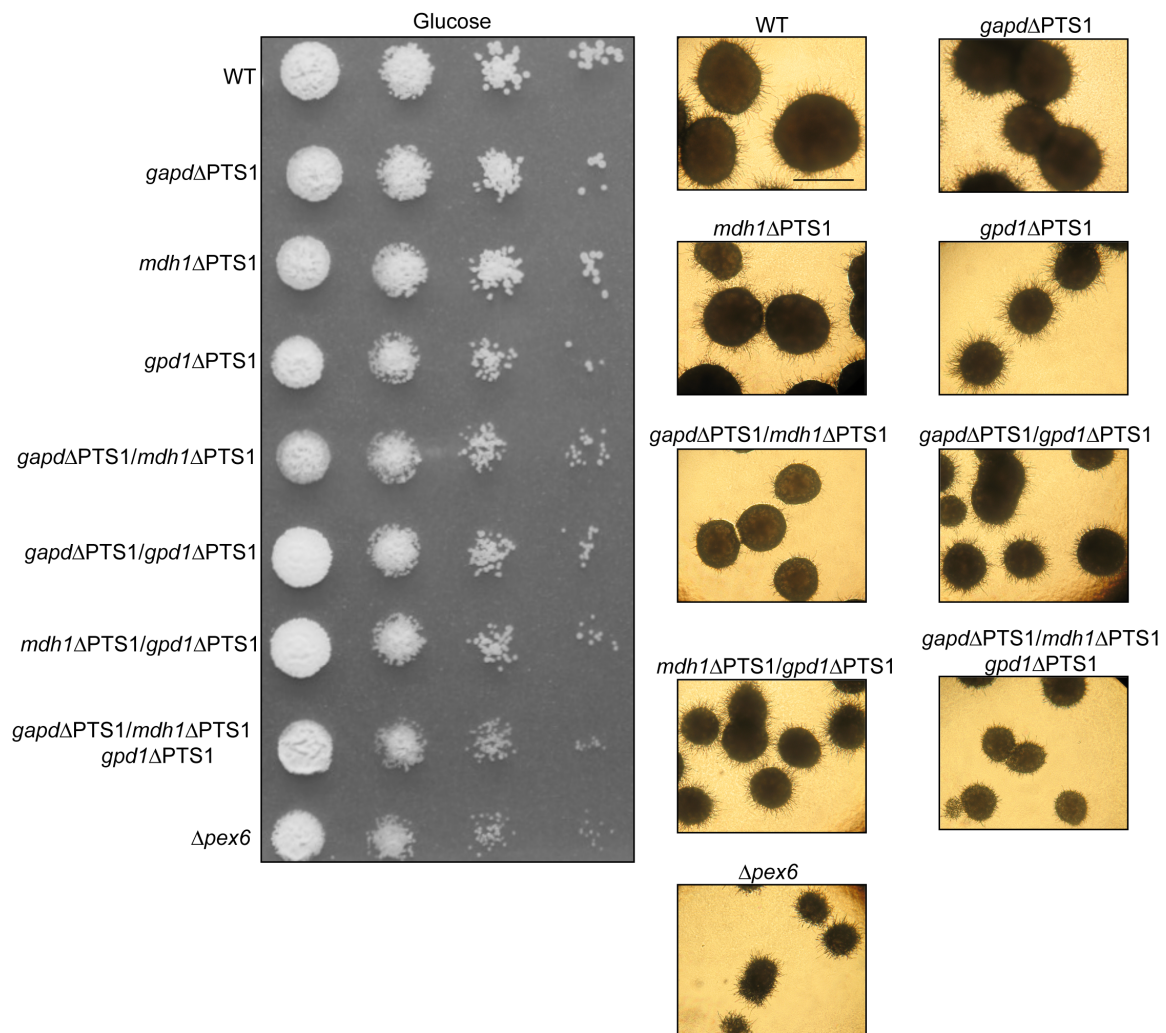


Abbildung 26: Wachstum von *gapd* Δ PTS1, *gpd1* Δ PTS1, *mdh1* Δ PTS1 und den möglichen Kombinationen auf Glucose

Serielle Verdünnungen der angegebenen Stämme wurden ausgehend von einer OD₆₀₀ von 0,1 auf Minimalmedium mit Glucose getropft und 48h bei 28°C inkubiert. Rechts sind Vergrößerungen einzelner Kolonien dargestellt. Die Inkubationszeit betrug hier 36h. Der Größenstandard entspricht 500 μ m.

Die Wachstumsrate der *mdh1* Δ PTS1 und *gapd* Δ PTS1 Mutanten war nicht verändert. Allerdings führte die Kombination beider Mutationen zu einer geringeren Koloniegröße auf Glucose haltigem Medium (Abb. 26). Die Deletion des PTS1 von Gpd1 hingegen hatte einen direkten Einfluss auf die Größe der Kolonien, aber auch dieser Phänotyp wurde durch die Kombination mit einer der anderen beiden Mutanten noch verstärkt (Abb. 26). Die gleichzeitige Mutation aller drei PTS1-Motive hatte die deutlichste Verminderung des

Wachstums zur Folge und war kaum von einer Deletion von *pex6* zu unterscheiden. Aus diesen Daten kann ein Zusammenhang zwischen dem Wachstumsphänotyp von $\Delta pex6$ Mutanten auf Glucose und der Anwesenheit peroxisomaler NADH abhängiger Dehydrogenasen abgeleitet werden. Der Wachstumsdefekt dieser Mutanten auf Glucose wurde quantifiziert, indem die Koloniegröße ausgemessen und deren Fläche bestimmt bzw. das Wachstum in Flüssigmedium quantifiziert wurde (Abb. 27; Tab. A1).

Sowohl die Quantifizierung der Koloniegröße auf Festmedium als auch ein Wachstumstest in Flüssigmedium bestätigten das zuvor beschriebene Ergebnis (Abb 27; Tabelle A1). Die gemeinsame Deletion der PTS1-Motive aller drei NAD abhängigen Dehydrogenasen führte zu einem ähnlichen Wachstumsphänotyp auf Glucose haltigem Medium wie die Deletion von *pex6*.

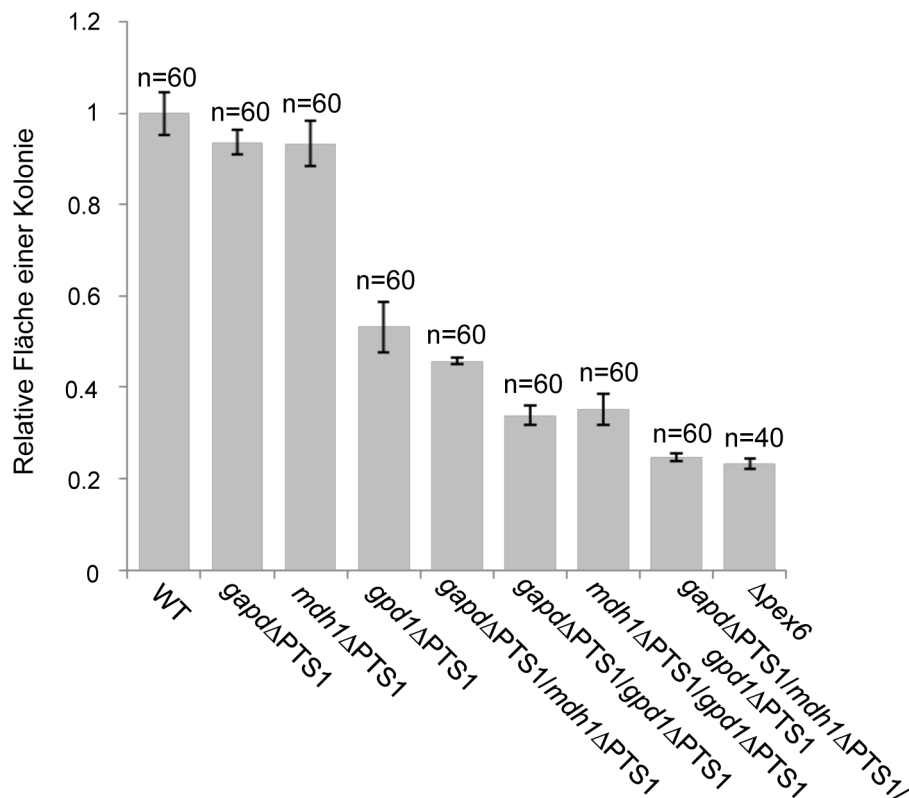


Abbildung 27: Quantifizierung der Koloniegröße

Um die Wachstumsdefekte der $\Delta PTS1$ -Mutanten quantitativ zu erfassen, wurden Einzelkolonien 36h nach dem Tropfen ausgemessen und deren Fläche berechnet. Es wurden drei biologische Replikate angefertigt und die Fläche der angegebenen Anzahl an Kolonien bestimmt (n).

In *S. cerevisiae* ist die NAD abhängige, peroxisomale Malatdehydrogenase (Mdh3) notwendig für die Nutzung von Ölsäure als C-Quelle, um das entstehende NADH zu NAD⁺ zu regenerieren (Van Roermund *et al*, 1995). Die Stämme, die $\Delta PTS1$ -Versionen von GAPDH, Gpd1 und Mdh1 aus *U. maydis* enthalten, wurden deshalb daraufhin überprüft, ob

sie noch in der Lage sind, Ölsäure als alleinige Kohlenstoffquelle zu verwerten. Ähnlich wie bei den Wachstumsuntersuchungen auf Glucose haltigem Medium waren *gpd1ΔPTS1* Mutanten schlechter in der Lage zu proliferieren (Abb. 28). Dieser Effekt wurde durch die zusätzliche Deletion der PTS1-Motive von GAPDH und Mdh1 verstärkt. Das Wachstum dieser Mutanten wurde ebenfalls in Flüssigmedium überprüft und quantifiziert. Auch bei dieser Quantifizierung in Ölsäure haltigem Flüssigmedium ergaben sich additive Effekte (Tab. A1). Die Mutanten, in denen die PTS1-Motive aller drei Dehydrogenasen gleichzeitig deletiert wurden, waren jedoch im Gegensatz zu $\Delta pex6$ Stämmen immer noch in der Lage, auf Medium mit Ölsäure als einziger C-Quelle zu wachsen (Abb 28; Tab. A1).

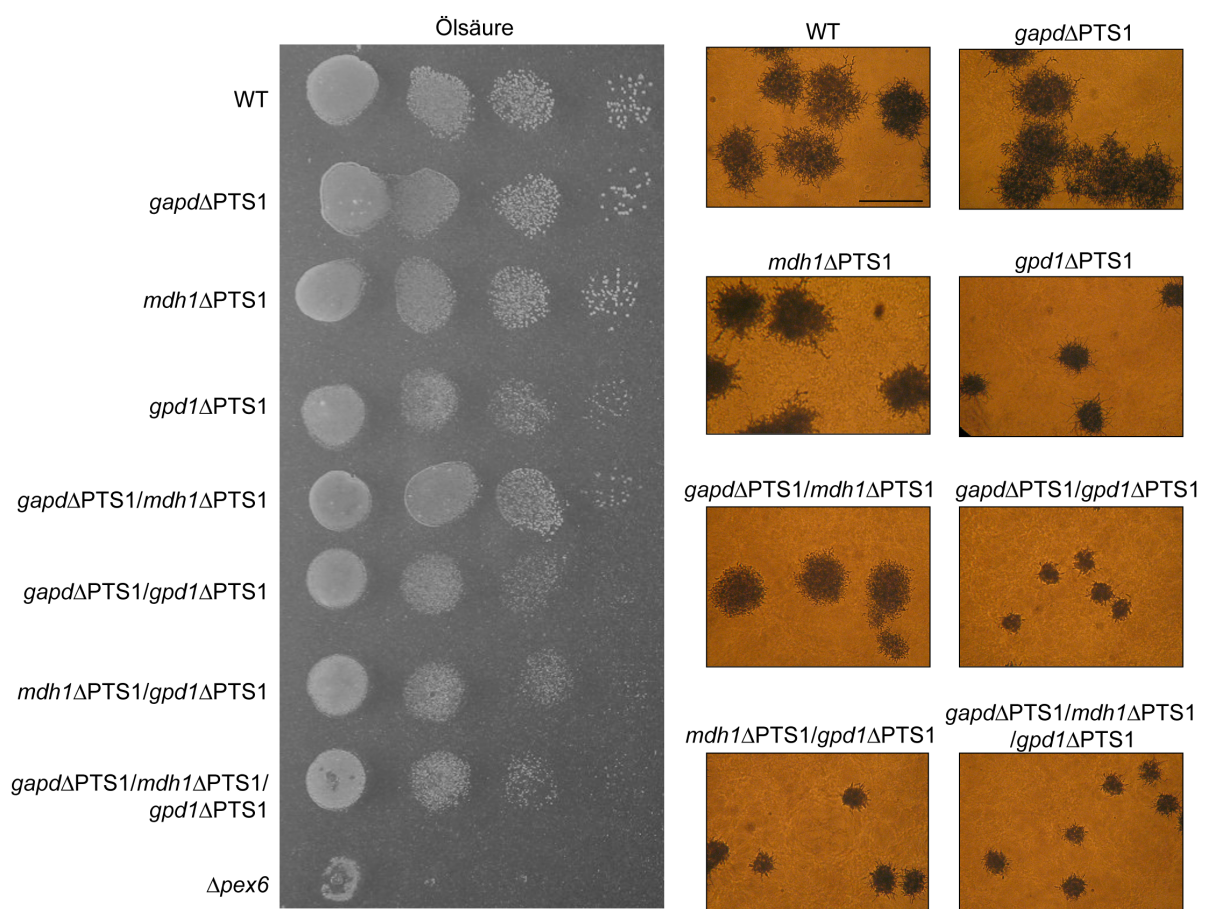


Abbildung 28: Wachstum von *gapdΔPTS1*, *gpd1ΔPTS1*, *mdh1ΔPTS1* und den möglichen Kombinationen auf Ölsäure

Serielle Verdünnungen der angegebenen Stämme wurden ausgehend von einer OD₆₀₀ von 1 auf Minimalmedium mit Ölsäure getropft und 48h bei 28°C inkubiert. Rechts sind Vergrößerungen einzelner Kolonien dargestellt. Der Größenstandard entspricht 300 µm.

Die synthetischen Wachstumsdefekte von *gapdΔPTS1* mit *mdh1ΔPTS1* und *gpd1ΔPTS1* legen eine gemeinsame Funktion der NAD abhängigen Dehydrogenasen, zu denen auch GAPDH gehört, bei der Homöostase von NADH und beim Stoffwechsel von Fettsäuren nahe.

Die peroxisomale Lokalisierung der drei Enzyme hat in *U. maydis* allerdings keine essentielle Funktion für den Metabolismus von Ölsäure. Daher gibt es in *U. maydis* vermutlich weitere Wege NAD^+ zu regenerieren.

2.6.3 Peroxisomen beeinflussen das Wachstum von *U. maydis* auf verschiedenen Zuckern

In einer vorhergehenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass peroxisomale Mutanten in dem Basidiomyceten *Cryptococcus neoformans* Wachstumsdefekte auf Glucose jedoch nicht auf Galactose aufweisen (Idnurm *et al.*, 2007). Daher wurden die Wachstumsrate der $\Delta pex6$ Mutante und der Mutante mit konstitutiv zytoplasmatischen Versionen von GAPDH, Mdh1 und Gpd1 auf unterschiedlichen Zuckern untersucht.

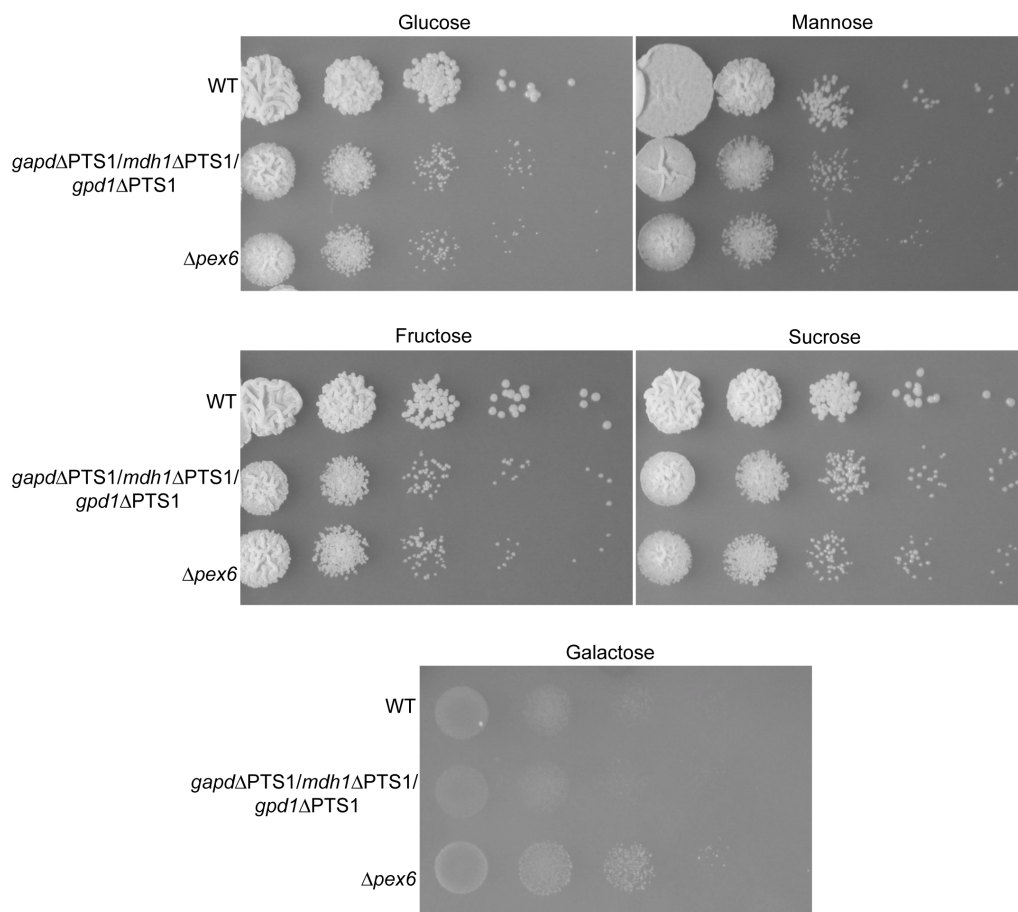


Abbildung 29: Die Deletion von *pex6* führt zu stärkerem Wachstum von *U. maydis* auf Galaktose-Medium

Die angegebenen Stämme wurden in serieller Verdünnung auf Minimalmedium getropft. Die angegebenen Zucker wurden als Kohlenstoffquelle zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 48h bei 28°C.

Die Koloniegröße der $\Delta pex6$ Mutanten und der $gapd\Delta PTS1$ $mdh1\Delta PTS1$ $gpd1\Delta PTS1$ Mutante war im Vergleich mit dem Wildtyp auf allen getesteten Zuckern mit der Ausnahme von Galactose deutlich reduziert. Bemerkenswert war, dass sowohl der Wildtyp als auch die Dreifachmutante kaum auf Galactose-Platten proliferierten, während die $\Delta pex6$ Mutante auf diesem Zucker erkennbar proliferierte. Die Abwesenheit funktioneller Peroxisomen beeinflusst demnach in *U. maydis* den Stoffwechsel oder die Toxizität von Galactose (Edgecombe, 1938; Knudson, 1915).

2.7 GAPDH und PGK sind Teil eines größeren metabolischen Netzwerks in Peroxisomen

Die Reaktion der GAPDH und der GPD werden durch eine Triosephosphat Isomerase (TPI) verknüpft, die die Isomerisierung von Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat reversibel katalysiert (siehe Abb. 2). Da sowohl GAPDH als auch Gpd1 in *U. maydis* partiell in Peroxisomen lokalisieren, wurde auch die Sequenz von *tpi1* (*um03299*) nach Anzeichen für peroxisomale Lokalisation untersucht.

2.7.1 Peroxisomale Varianten von TPI in *U. maydis* und *A. nidulans*

Bei der Untersuchung des *tpi1*-Gens konnte ein kryptisches PTS1-Motiv identifiziert werden, das durch das Überlesen des ersten Stopcodons entsteht (Abb. 30a). Deshalb wurde ein Plasmid hergestellt, das für eine N-terminale GFP Fusion von Tpi1 codiert. Das erste Stopcodon von *tpi1* wurde in dieser Fusion in ein Serincodon ersetzt (GFP-TPI_{pex}), um die durch das Überlesen des Stopcodons potentiell entstehende Isoform künstlich zu erzeugen. Dieses Konstrukt wurde in den *ip*-Locus von *U. maydis* integriert und resultierende Transformanten fluoreszenzmikroskopisch analysiert. GFP-Tpi1_{pex} lokalisierte vornehmlich zusammen mit mCherry-SKL in Peroxisomen (Abb. 30a). In *U. maydis* entsteht demzufolge vermutlich eine peroxisomale Isoform eines weiteren glykolytischen Enzyms durch das Überlesen des Stopcodons.

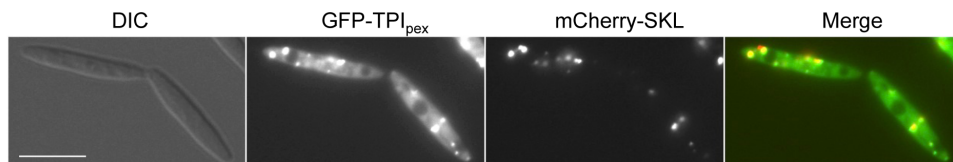
Auch in der Genomsequenz des Ascomyceten *A. nidulans* wurde nach einer peroxisomalen Variante der TPI gesucht, um die evolutionäre Konservierung der dualen Lokalisierung dieses Enzyms nachzuweisen. Dabei wurden keine Anhaltspunkte für ein Überlesen des Stopcodons

bzw. für alternatives Spleißen in der Sequenz von *tpiA* (www.aspgd.org) gefunden. Allerdings endet das Enzym aus *A. nidulans* auf die Aminosäureabfolge ARL, die stark an ein PTS1-Motiv erinnert (Abb. 30b). Obwohl die PTS1-Vorhersage für die letzten zwölf Aminosäuren einen negativen Wert ergab, konnte bei heterologer Expression in *S. cerevisiae* festgestellt werden, dass diese zwölf Aminosäuren ausreichend für eine peroxisomale Lokalisation von RFP-PTS1_{TPI} sind (Abb. 30b).

a

U. maydis: Triosephosphatisomerase (*tpi1*: um03299)

(a)												(b)			
AAC	GCT	AAC	GCT	<u>TGA</u>	CTA	GCT	GGC	CAG	TCG	GCT	AGG	ATC	<u>TGA</u>		
N	A	N	A	*	L	A	G	Q	S	A	R	I	*		
C-Terminus												PTS1-Vorhersage			
(a): -KPEFVDIVNANA*												-21.5			
(b): -KPEFVDIVNANA* LAGQARI*												+0.7			

**b**

A. nidulans: Triosephosphatisomerase (*tpiA*: Gene ID: 2870611): PTS1-Vorhersage: -10.5

AAG	CCT	GCC	T	<u>GTACGT</u>	<u>TAG</u>	TC	GTC	GAT	ATT	GTC	AAT	GCC	CGC	CTG	<u>TAA</u>
K	P	A					F	V	D	I	V	N	A	R	L	*

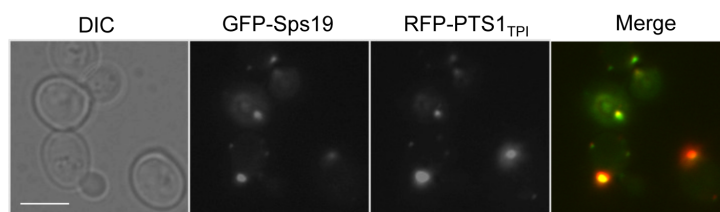


Abbildung 30: Kryptische peroxisomale Isoformen der TPI aus *U. maydis* und *A. nidulans*

a; Oben ist die DNA-Sequenz und das resultierende C-terminale PTS1-Motiv der TPI aus *U. maydis* dargestellt. Der charakteristische Anteil des PTS1 ist hervorgehoben und der Wert für die PTS1-Vorhersage angegeben. Die C-terminalen zwölf Aminosäuren wurden als GFP-Fusion zusammen mit mCherry-SKL fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Der Größenstandard entspricht 10 µm.

b; Die Abbildung zeigt in Analogie zu a Teile der Sequenz von TPI aus *A. nidulans*. Die Lokalisation der C-terminalen 12 Aminosäuren fusioniert an RFP wurde zusammen mit GFP-Sps19 fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Der Größenstandard entspricht 5 µm. Die Referenz für *tpiA* ist aus NCBI.

Damit befindet sich sowohl in *U. maydis* als auch in *A. nidulans* ein metabolisches Netzwerk aus GAPDH, Gpd1, PGK und TPI partiell in den Peroxisomen. Interessanterweise wurde bei einer Analyse des peroxisomalen Proteoms von *P. chrysogenum* neben der TPI auch noch die

Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase (FBA) als potentiell peroxisomales Protein identifiziert (Kiel *et al.*, 2009).

2.7.2 Die Fructose-1,6-bisphosphat Aldolasen von *U. maydis* und *A. nidulans* enthalten funktionelle PTS1-Motive

Während der Glykolyse katalysiert die Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase (FBA) die Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat.

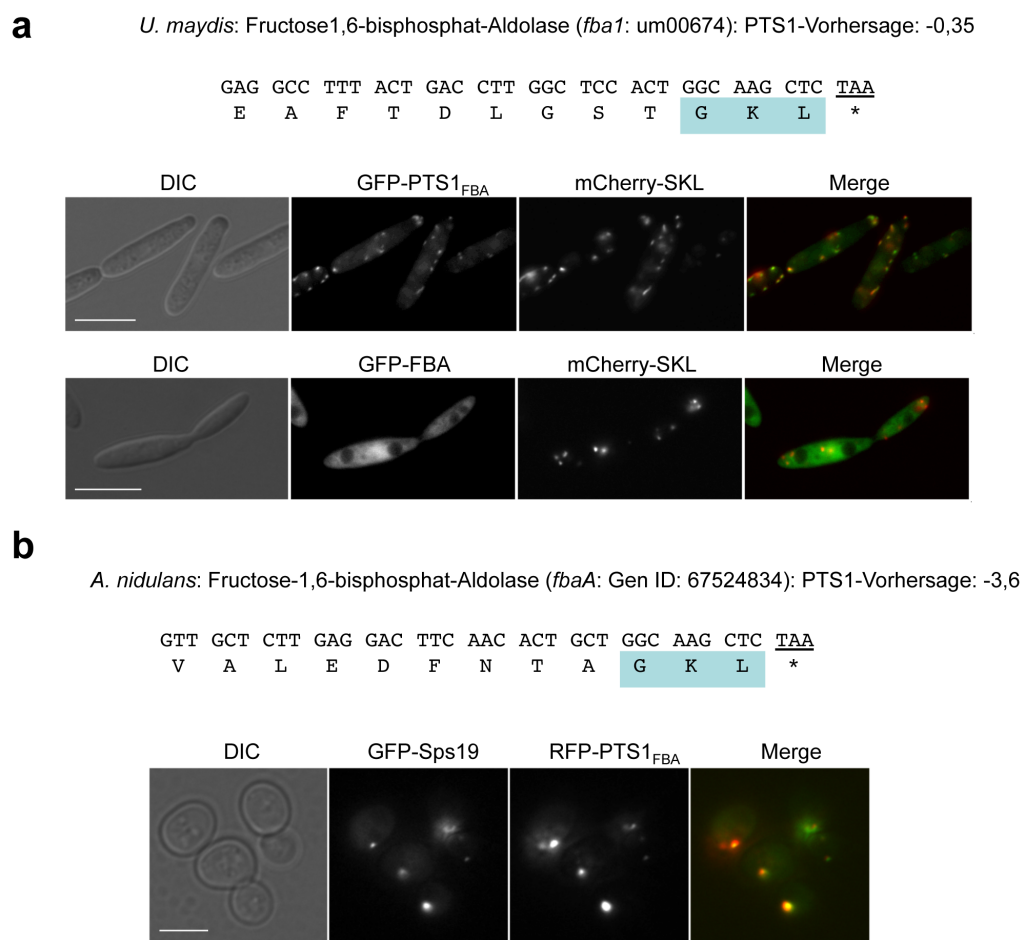


Abbildung 31: Die FBA enthält in *U. maydis* und *A. nidulans* PTS1-Motive

a; Oben ist die DNA-Sequenz und das resultierende C-terminale PTS1-Motiv von FBA aus *U. maydis* dargestellt. Der charakteristische Anteil des PTS1 ist hervorgehoben und der Wert für die PTS1-Vorhersage angegeben. Die c-terminalen zwölf Aminosäuren wurden als GFP-Fusion zusammen mit mCherry-SKL fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Darüber hinaus wurde auch die Lokalisation des gesamten Proteins (GFP-FBA) überprüft. Der Größenstandard entspricht 10 µm.

b; Die Abbildung zeigt in Analogie zu a Teile der Sequenz von FBA aus *A. nidulans*. Die Lokalisation der C-terminalen 12 Aminosäuren fusioniert, an RFP wurde zusammen mit GFP-Sps19 fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Der Größenstandard entspricht 5 µm. Die Sequenz-ID ist aus NCBI.

Eine genauere Analyse der codierenden DNA-Sequenzen ergab ebenfalls Hinweise für die duale Lokalisation dieses Enzyms im Zytoplasma und in den Peroxisomen von *U. maydis* und *A. nidulans*. Ähnlich der TPI von *A. nidulans* endet die FBA beider Pilze auf ein mögliches PTS1-Motiv mit leicht negativer Vorhersage (Abb. 31). Die C-terminalen zwölf Aminosäuren von FBA aus *U. maydis* und aus *A. nidulans* führten beide zum Import von GFP bzw. RFP in die Peroxisomen von *U. maydis* bzw. *S. cerevisiae* (Abb. 31a und b). Das Volllängenprotein GFP-FBA in *U. maydis* lokalisiert vorwiegend im Zytoplasma (Abb. 31a). Eine mögliche partielle peroxisomale Lokalisierung der FBA kann demnach nicht beobachtet werden, könnte jedoch vom zytoplasmatischen Fluoreszenz überlagert sein. Da das PTS1-Motiv jedoch funktionell ist, kann vermutet werden, dass auch das ganze Protein zumindest partiell in den Peroxisomen lokalisiert ist.

Neben alternativem Spleißen und dem gezielten Überlesen von Stopcodons können also vermutlich auch PTS1-Motive mit schlechter Effizienz (vgl. TpiA) eine duale Lokalisation glykolytischer Enzyme im Peroxisom und dem Zytoplasma hervorrufen.

2.7.3 Das Enzym Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK) aus *U. maydis* enthält ein PTS1-Motiv

Alle bisher identifizierten glykolytischen Enzyme mit dualer Lokalisierung in den Peroxisomen und dem Zytoplasma katalysieren Gleichgewichtsreaktion. Sie sind damit auch in der Lage, die Rückreaktion in gluconeogenetischer Richtung zu katalysieren. Trotz intensiver Suche konnten in *U. maydis* keine Anzeichen für versteckte PTS1-Motive der rein glykolytischen Enzyme Pyruvatkinase und Phosphofructokinase entdeckt werden (nicht gezeigt).

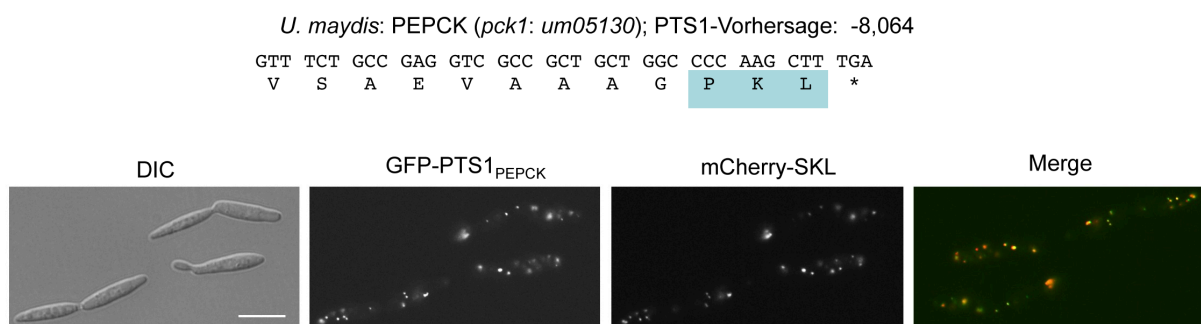


Abbildung 32: Die PEPCK aus *U. maydis* enthält ein PTS1-Motiv

Oben ist DNA-Sequenz und das potentielle C-terminale PTS1-Motiv der PEPCK aus *U. maydis* gezeigt. Der charakteristische Anteil des PTS1 ist hervorgehoben und der Wert für die PTS1-Vorhersage angegeben. Die Lokalisation von GFP-PTS1_{PEPCK} wurde fluoreszenzmikroskopisch in *U. maydis* untersucht. Die Co-Lokalisation mit mCherry-SKL ist im „Merge“ zu sehen. Der Größenstandard entspricht 10 µm.

Jedoch weist die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK), die für einen entscheidenden Schritt bei der Gluconeogenese verantwortlich ist, ein PTS1 ähnliches Motiv mit leicht negativer Vorhersage auf (Abb. 32). Dieses Enzym wird nicht für die Glykolyse verwendet und katalysiert mit der Umwandlung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat den initialen Schritt in der Gluconeogenese. Die C-terminalen zwölf Aminosäuren der PEPCK führten zur Lokalisation von GFP in den Peroxisomen von *U. maydis* (Abb. 32). Folglich könnten in dieser Arbeit gefundene peroxisomale Isoformen glykolytischer bzw. gluconeogenetischer Enzyme auch eine Bedeutung bei der Gluconeogenese haben. Daher wurde untersucht, ob Stämme mit ausschließlich zytoplasmatischen Varianten von GAPDH und PGK bzw. $\Delta pex6$ Mutanten L-Prolin als Kohlenstoffquelle verwerten können. L-Prolin als Kohlenstoffquelle führt z. B. in *A. nidulans* zur drastischen Induktion der Gluconeogenese (Hynes *et al*, 2007) .

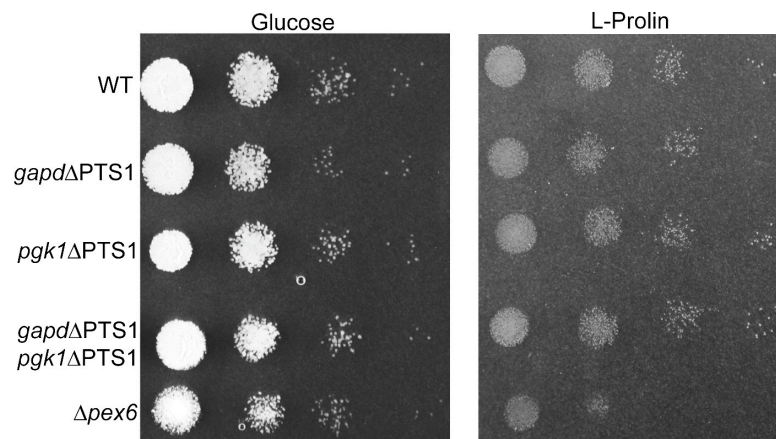


Abbildung 33: Peroxisomen haben in *U. maydis* eine Funktion bei der Gluconeogenese

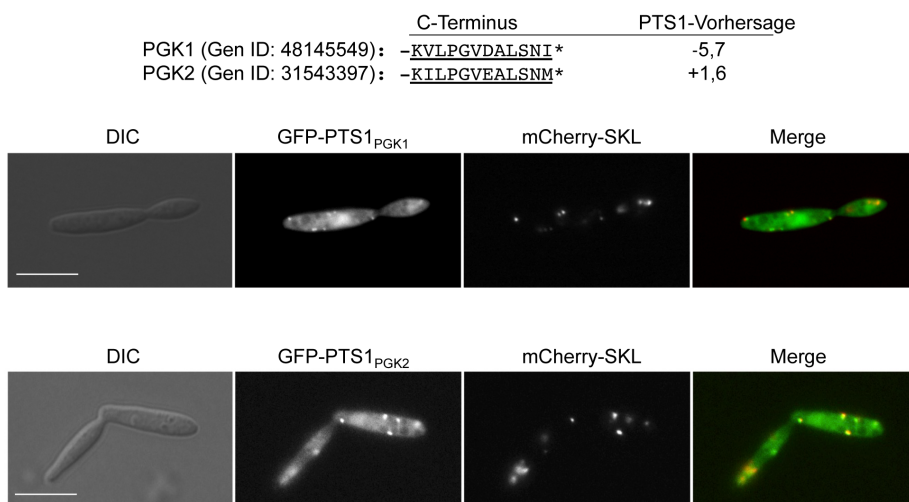
Serielle Verdünnungen der angegebenen Stämme wurden auf Festmedien mit den angegebenen Kohlenstoffquellen aufgetropft. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 28°C.

Die Experimente zeigten, dass die peroxisomalen Varianten von GAPDH und PGK nicht für das Wachstum auf L-Prolin benötigt werden (Abb.33). $\Delta pex6$ Mutanten hatten jedoch einen drastischen Phänotyp (Abb. 33). Peroxisomen könnten demnach eine Funktion bei der Gluconeogenese haben, allerdings wahrscheinlich unabhängig vom peroxisomalen Import von GAPDH und PGK.

2.8 Anzeichen für peroxisomalen Import von PGK-Homologen aus *Homo sapiens* und *Bos taurus*

Um zu überprüfen, ob kryptische peroxisomale Isoformen glykolytischer Enzyme in höheren Eukaryoten vorhanden sind, wurde nach entsprechenden Anzeichen in den Genomsequenzen gesucht. Während in Pflanzen keine Hinweise für solche Isoformen auffielen, enthalten zwei PGK-Isoformen aus Menschen potentielle PTS1-Motive (Abb. 34a).

a *Homo sapiens*



b

Bos taurus

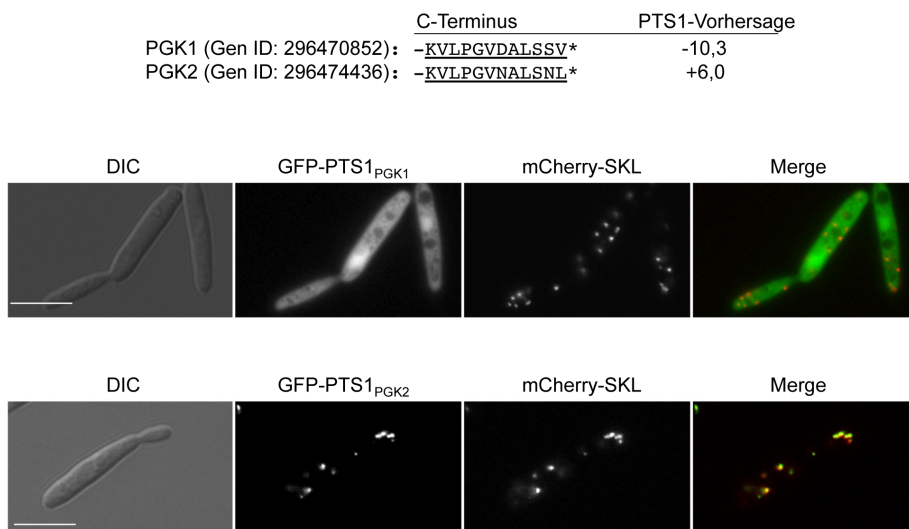


Abbildung 34: PTS1-Motive in PGK Homologen aus Säugetieren

a; Oben sind die C-terminalen Sequenzen von zwei PGK Varianten aus *Homo sapiens* mit zugehöriger PTS1-Vorhersage dargestellt.

b; Oben sind die entsprechenden Varianten aus *Bos taurus* dargestellt.

a und b; Die zwölf C-terminalen Aminosäuren der vier Enzyme wurde fusioniert an GFP in *U. maydis* exprimiert und zusammen mit mCherry-SKL mikroskopisch untersucht. Die Größenstandards entsprechen 10 µm. Identifizierungsnummern sind aus NCBI.

Sowohl die C-terminalen zwölf Aminosäuren von PGK1 (klassische PGK Isoform) als auch von PGK2 (Hoden-spezifische PGK Isoform) führten zur Akkumulation von GFP in den Peroxisomen von *U. maydis* (Abb. 34a). Das PTS1-Motiv der Hoden-spezifischen PGK-Variante aus Rindern (*Bos taurus*) ist ebenfalls funktionell. Eine entsprechende GFP-Fusion lokalisierte sogar ausschließlich in den Peroxisomen von *U. maydis* (Abb. 34b). Obwohl in anderen glykolytischen Enzymen aus Säugetieren bisher keine PTS1-Motive identifiziert werden konnten, erscheint es nicht unwahrscheinlich, dass eine duale Lokalisierung glykolytischer Enzyme im Zytoplasma und in Peroxisomen auch in Tieren zu finden ist. Eventuell beschränkt sich die peroxisomale Lokalisierung jedoch auf bestimmte Gewebe oder Organe.

2.9 Die Synthese von Mannosylerythritol Lipiden (MEL) findet zum Teil in den Peroxisomen von *U. maydis* statt

Bei der Suche nach neuartigen peroxisomalen Proteinen in *U. maydis* wurden potentielle PTS1-Motive in zwei Acyltransferasen identifiziert (Abb. 35).

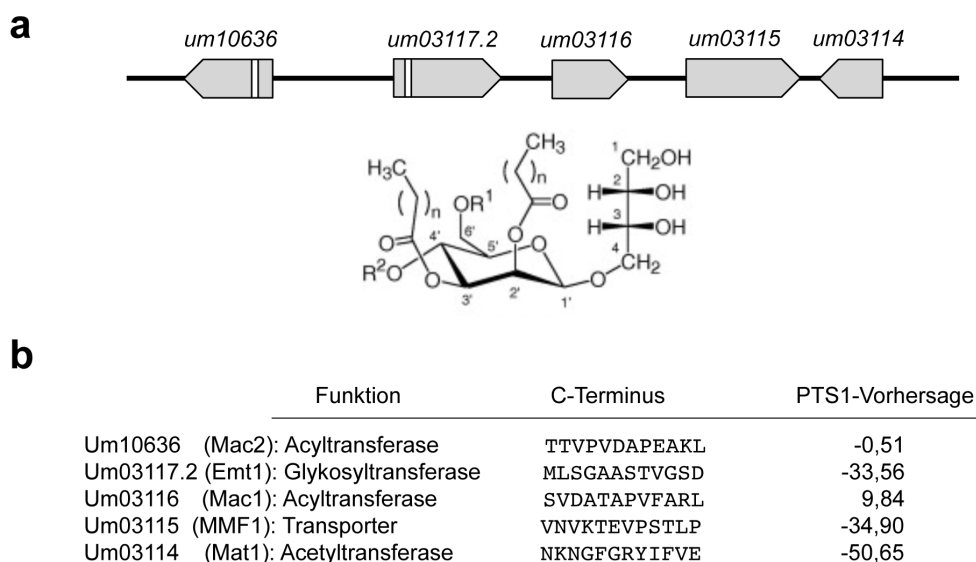


Abbildung 35: Der „Gencluster“ für die Synthese von MELs enthält zwei Acyltransferasen mit möglichen PTS1-Motiven

a; Oben ist der „Gencluster“ für die MEL-Biosynthese schematisch dargestellt. Unten ist die Struktur von MELs zu sehen. Emt1 ist für die Glykosylierung an C4 zuständig. Mac1 und Mac2 übertragen Acylgruppen variabler Länge, wobei eine mögliche Positionsspezifität nicht geklärt ist. Mat1 ist für die Acetylierung an C4' und C5' notwendig. MMF1 ist möglicherweise für den Export der MELs aus der Zelle verantwortlich. (verändert nach Fukuoka *et al*, 2008; Hewald, 2005; Hewald *et al*, 2006)

b; Den im Cluster codierten Proteinen sind ihre Bezeichnungen und die zwölf C-terminalen Aminosäuren zugeordnet, die für die PTS1-Vorhersage verwendet wurden.

Für beide war bereits gezeigt worden, dass sie sich in einem Gencluster befinden, der für die Synthese von MELs verantwortlich ist (Hewald *et al*, 2006). MELs werden von *U. maydis* in der Abwesenheit einer Stickstoffquelle produziert (Haskins *et al*, 1955). In genetischen und biochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, welche katalytische Funktion die vom Cluster codierten Enzyme bei der Herstellung der MELs haben (Hewald *et al*, 2006; Abb. 35).

2.9.1 Die beiden Acyltransferasen Mac1 und Mac2 lokalisieren in den Peroxisomen von *U. maydis*

Um die mögliche peroxisomale Lokalisierung der Acyltransferasen Mac1 und Mac2 zu untersuchen, wurden Plasmide hergestellt, die N-terminale GFP-Fusionen beider Enzyme codieren und unter Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors exprimieren. Nach erfolgreicher Integration in den *ip*-Locus des *U. maydis* Stamms MB215 mCherry-SKL, wurde die Lokalisation der beiden Acyltransferasen überprüft (Abb. 36a).

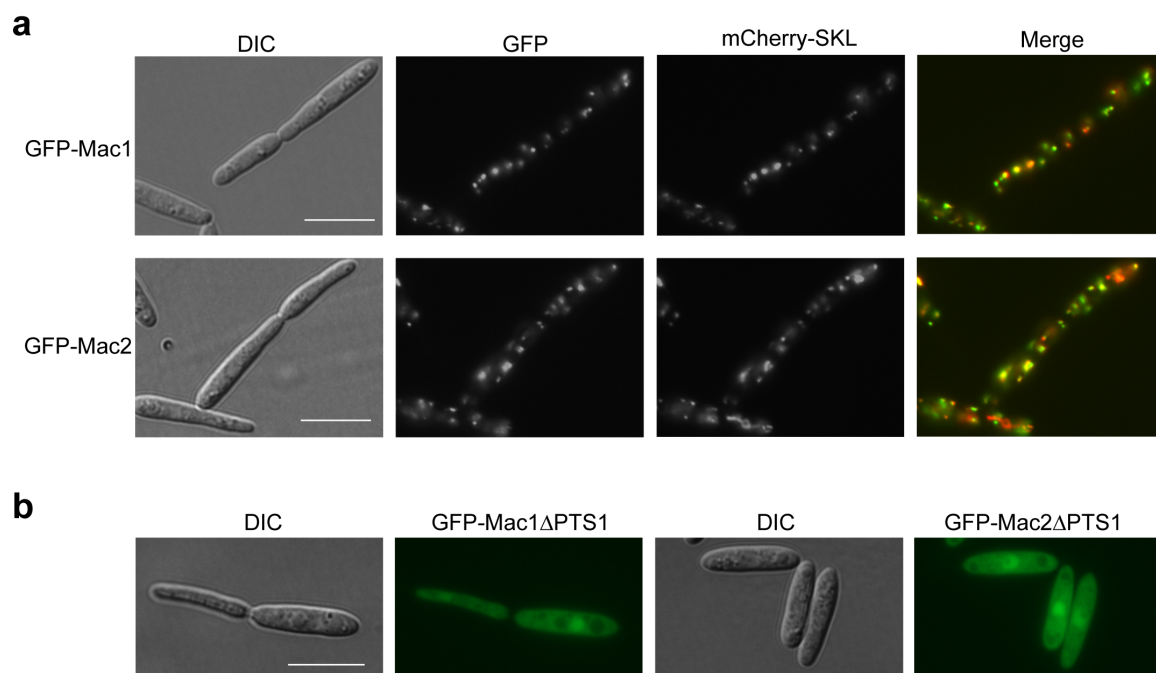


Abbildung 36: Lokalisierung von Mac1 und Mac2

a; Die Lokalisation von GFP-Mac1 und GFP-Mac2 wurde mikroskopisch untersucht. mCherry-SKL diente als Referenz für die Peroxisomen. Der Größenstandard entspricht 10 µm.

b; Die Lokalisation von GFP-Mac1ΔPTS1 und GFP-Mac2ΔPTS1 wurde mikroskopisch untersucht. Der Größenstandard entspricht 10 µm.

Beide Enzyme lokalisierten ausschließlich in Peroxisomen (Abb. 36a). Als Kontrolle wurden Konstrukte hergestellt, in denen die codierende Sequenz für die letzten drei Aminosäuren

deletiert war. Diese mutierten Formen waren nicht mehr in der Lage, in die Peroxisomen zu gelangen und lagen diffus im Zytoplasma verteilt vor (Abb. 36b). Zwei entscheidende Schritte während der Biosynthese von MELs finden demnach vermutlich innerhalb der Peroxisomen statt.

2.9.2 Die zytoplasmatische Lokalisierung von Mac1 und Mac2 führt zur Synthese abgewandelter MELs

Die peroxisomale Lokalisierung zweier entscheidender Enzyme für die MEL-Produktion führte zu der Frage, ob diese Kompartimentierung notwendig für die Herstellung der MELs ist. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Anwesenheit beider Acyltransferasen für die Synthese der Lipide benötigt wird (Hewald *et al.*, 2006). Zunächst wurden *mac1* und *mac2* in dem Stamm MB215 deletiert (MB215 Δ *mac1* Δ *mac2*). Der Stamm MB215 produziert im Vergleich zu anderen Isolaten größere Mengen Glykolipide (Hewald *et al.*, 2005). Außerdem wurden Konstrukte erzeugt, die *mac1* und *mac2* gleichzeitig unter Kontrolle der endogenen Promotoren enthalten. Die Acyltransferasen enthalten in diesen Konstrukten entweder den Bereich, der für die PTS1-Motive codiert (*mac1 mac2*) oder dieser Bereich wurde entfernt (*mac1* Δ PTS1 *mac2* Δ PTS1). Diese Konstrukte wurden in den *ip*-Lokus von MB215 Δ *mac1* Δ *mac2* integriert. Die resultierenden Stämme wurden in Medium ohne Stickstoffquelle für drei Tage inkubiert und anschließend die mit Ethylacetat extrahierten Glykolipide mithilfe einer Dünnschichtchromatographie untersucht (Abb. 37a).

Bei der Untersuchung der MELs und einer zweiten Gruppe von Glykolipiden den Ustilaginsäuren (UA; Haskins, 1950) wurde deutlich, dass die PTS1-Motive nicht generell notwendig für die Produktion der MELs sind (Abb. 37a). Das veränderte Laufprofil der MELs aus Stämmen mit rein zytoplasmatischen Acyltransferasen zeigte jedoch, dass ohne PTS1-Motive vermutlich veränderte Lipide gebildet werden (Abb. 37a). Außerdem beeinflusste die Anwesenheit von Mac1 und Mac2 im Zytoplasma die Produktion von Ustilaginsäuren (Abb. 37a). Eine Quantifizierung zeigte, dass die Menge an Ustilaginsäuren im Vergleich zum Wildtyp um etwa 50% reduziert war (Abb. A3).

Um genauere Informationen über die veränderten MELs in Stämmen ohne peroxisomale Acyltransferasen zu erhalten, wurden die Glycolipidextrakte in Zusammenarbeit mit Uwe Linne vom Fachbereich Chemie (Philipps-Universität Marburg) mithilfe von Massenspektrometrie analysiert. Bei der Auftrennung der Lipidextrakte durch HPLC („high performance liquid chromatography“) wurde deutlich, dass sich die Zusammensetzung der

MELs im Wildtyp und der Mutante ohne peroxisomale Acyltransferasen voneinander unterscheidet (Abb. 37b).

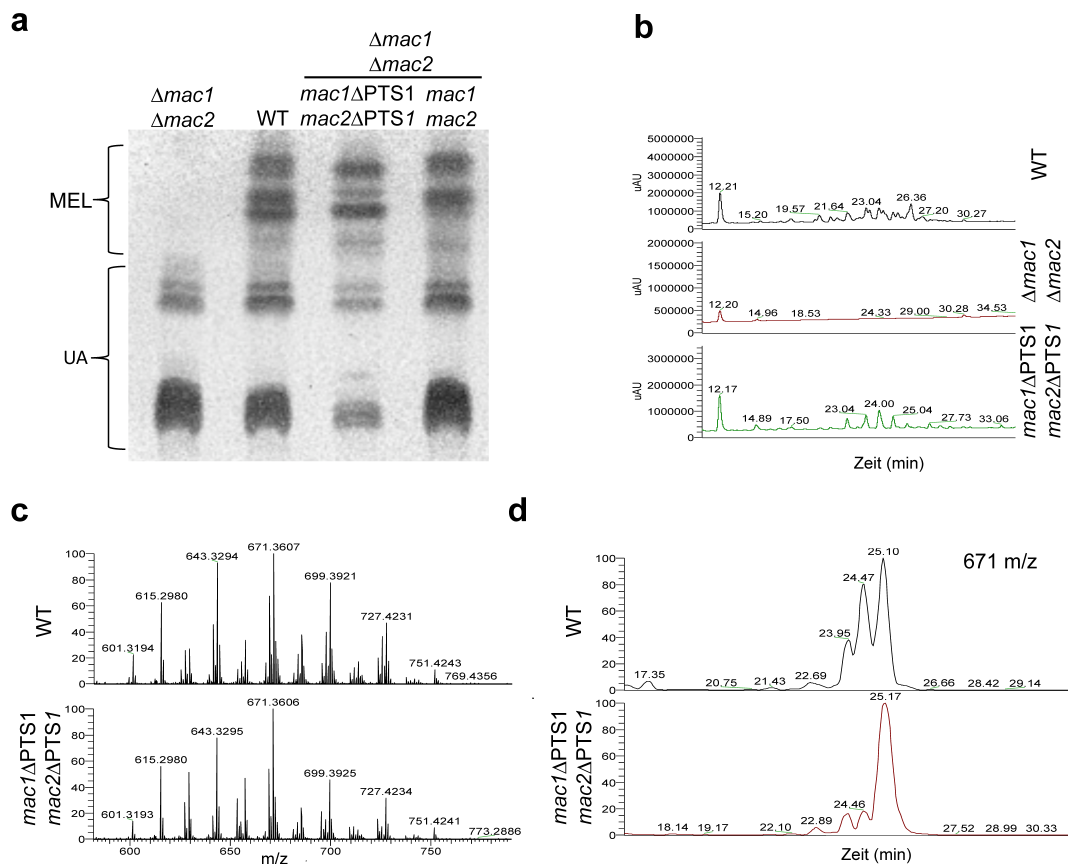


Abbildung 37: Acyltransferasen ohne PTS1 führen zur Herstellung von abgewandelten MELs

a; Lipidextrakte aus den angegebenen Stämmen wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Durch Besprühen mit einem Gemisch von Essigsäure/Schwefelsäure/Anisaldehyd (50/1/0,5) und durch etwa zweiminütige Inkubation bei 150°C wurden enthaltene Glykolipide sichtbar gemacht.

b; Die Abbildung zeigt die UV-Spektren von Lipidextrakten der angegebenen Stämme im MEL-Bereich bei 215nm nach HPLC Aufreinigung.

c; Die gemittelten Massen im MEL-Bereich sind für den Wildtyp und eine Mutante ohne peroxisomale Acyltransferasen dargestellt.

d; Die Fragmentierung der Masse 671 weist auf das Vorhandensein einer unterschiedlichen Zusammensetzung der MELs dieser Masse im Wildtyp und der Mutante mit zytoplasmatischen Acyltransferasen hin.

Als Referenz diente der Stamm MB215 $\Delta mac1 \Delta mac2$, der nicht mehr in der Lage ist, MELs zu synthetisieren. Erstaunlicherweise wichen die gemittelten Massenspektren der MELs vom Wildtyp und der Mutante mit rein zytoplasmatischen Acyltransferasen im Gegensatz zu den UV-Spektren nur leicht voneinander ab (Abb. 37c). Tendenziell wurden in den $\Delta PTS1$ -Mutanten mehr MELs kleinerer Massen identifiziert. MELs können sich jedoch in der Zusammensetzung der Acylgruppen unterscheiden und sich trotzdem zu einer identischen Gesamtmasse addieren (Hewald, 2005). Bei der Untersuchung der fragmentierten Massen fiel auf, dass im Wildtyp die Masse von 671 drei verschiedenen MELs entspricht (Abb. 37d).

Diese MELs unterscheiden sich durch die Kombination verschiedener Acylreste der Längen C16/C2, C14/C4 bzw. C12/C6. Dies gilt prinzipiell auch für die Mutante mit zytoplasmatischen Acyltransferasen. Allerdings war hier die Variante C16/C2 im Vergleich mit dem Wildtyp drastisch überrepräsentiert, während die beiden anderen MELs nur in geringem Maße vorhanden waren (Abb. 37d). Die Fragmentierung der anderen Massen führte zu ähnlichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt).

Demzufolge führt die peroxisomale Lokalisierung der Acyltransferasen in *U. maydis* zur Synthese von MELs die neben Palmitinsäure (Hexadecansäure) noch verkürzte Fettsäuren größerer Mengen enthalten. Möglicherweise ist dies bedingt durch eine Kopplung der MEL-Produktion an die peroxisomale β -Oxidation, bei der Fettsäuren variabler Länge als Zwischenprodukte gebildet werden. Außerdem verringert sich durch die zytoplasmatische Lokalisierung von Mac1 und Mac2 die Menge an Ustilaginsäuren, vermutlich durch Konkurrenz um das auch für Ustilaginsäuren notwendige Palmitat.

2.9.3 Homologe von Mac1 und Mac2 aus *A. nidulans* enthalten ebenfalls PTS1-Motive

Das Genom von *A. nidulans* enthält Acyltransferasen (AN8136.2 & AN8137.2), die starke Sequenzähnlichkeiten zu den im *U. maydis* „MEL-Cluster“ codierten Enzymen aufweisen (Hewald, 2005). Die entsprechenden Gene befinden sich im Genom von *A. nidulans* ebenfalls in direkter Nachbarschaft zueinander. Eine genauere Betrachtung dieser Gene zeigte, dass die beiden resultierenden Acyltransferasen ebenfalls PTS1-Motive enthalten.

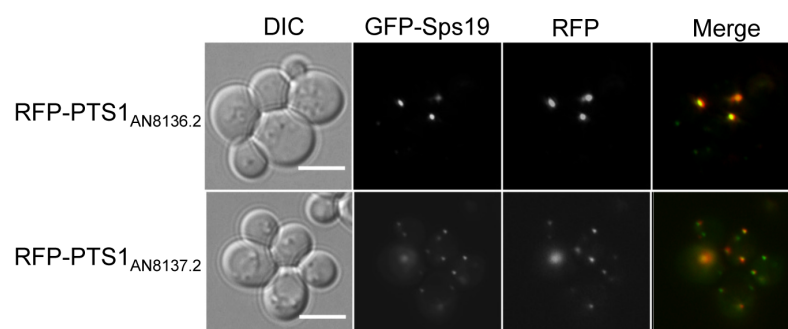


Abbildung 38: PTS1-Motive in Mac-Homologen aus *A. nidulans*

Die zwölf C-terminalen Aminosäuren von AN8136.2 und AN8137.2 wurden fusioniert an RFP in *S. cerevisiae* exprimiert. GFP-SPS19 diente als Referenz für die Peroxisomen. Der Größenstandard entspricht 5 μ m.

Zur Überprüfung ihrer Funktionalität wurden die C-terminalen zwölf Aminosäuren beider Acyltransferasen an RFP fusioniert und die Lokalisierung der entstehenden Fusionsproteine in *S. cerevisiae* untersucht. Die C-terminalen Motive aus beiden Acyltransferasen waren in der Lage, den Transport von RFP in die Peroxisomen zu vermitteln (Abb. 38).

Diese Daten sind ein Anzeichen dafür, dass die peroxisomale Kompartimentierung von Acyltransferasen für die Synthese von Sekundärmetaboliten konserviert sein könnte, auch wenn bisher nicht bekannt ist, ob von *A. nidulans* ein entsprechendes Glykolipid gebildet wird.

3 Diskussion

In den Untersuchungen zu dieser Arbeit konnten mit alternativem Spleißen, programmiertem Überlesen von Stopcodons und abweichenden PTS1-Motiven drei unterschiedliche Wege identifiziert werden, die dazu führen, dass eine Reihe glykolytischer Enzyme in verschiedenen Pilzen sowohl im Zytoplasma als auch in den Peroxisomen lokalisiert ist. Diese Beobachtung war unerwartet, da die Glykolyse in Pilzen und Tieren mit der Ausnahme der Trypanosomen als typischer Stoffwechselweg des Zytoplasmas gilt (Michels *et al*, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass die Mechanismen zur Erzeugung alternativer Isoformen der glykolytischen Enzyme in den betrachteten Pilzen variieren. Eine genauere Charakterisierung dieses Phänomens in *U. maydis* erlaubte dann erste Rückschlüsse auf die biologische Funktion der dualen Lokalisierung glykolytischer Enzyme und lieferte Hinweise auf eine Rolle der Peroxisomen beim Metabolismus von Zucker. Des Weiteren wurden während dieser Arbeit mehrere andere neuartige peroxisomale Proteine in *U. maydis* identifiziert und untersucht; unter anderem die Acyltransferasen Mac1 und Mac2, die an der Bildung von Glykolipiden in *U. maydis* beteiligt sind (Hewald *et al*, 2006).

3.1 Die Bedeutung und Verbreitung von alternativem Spleißen in Pilzen

Insbesondere vielzellige Organismen generieren eine hohe Variabilität von Transkripten durch differentielles Spleißen (Ast, 2004). In einer genomweiten Studie konnte gezeigt werden, dass bis zu 90% der humanen Transkripte alternativ gespleißt werden können (Wang *et al*, 2008). In dem einzelligen Pilz *C. neoformans* zeigen dagegen nur etwa 4,5% der Transkripte Spleißvarianten, obwohl dieser Basidiomycet im Vergleich mit anderen einzelligen Pilzen eine hohe Anzahl Introns aufweist (Loftus *et al*, 2005). Auch in Ascomyceten konnten nur vereinzelte alternative Transkriptvarianten nachgewiesen werden (Ebbole *et al*, 2004; Galagan *et al*, 2005; Kempken, 2013).

Einige neuere Arbeiten lieferten allerdings Hinweise dafür, dass alternatives Spleißen auch in einzelligen Pilzen alternative Proteinvarianten hervorbringt. Neben der hier beschriebenen Entdeckung von Spleißvarianten, die für peroxisomale Isoformen der glykolytischen Enzyme GAPDH und PGK codieren, wurden vor kurzem aus *Y. lipolytica* bzw. *C. albicans* Spleißvarianten von Transkripten entdeckt, die für eine Malatdehydrogenase bzw. eine 6-Phosphogluconatdehydrogenase mit PTS1 codieren (Kabran *et al*, 2012; Strijbis *et al*, 2012).

Ferner wurde in *U. maydis* differentielles Spleißen in Transkripten für Intersectin1 (Um06013) beobachtet, das eine entscheidende Rolle als Gerüstprotein bei der Endozytose spielt (Hlubek, 2008; O'Bryan, 2010). Die längere Isoform enthält am C-Terminus einen Guaninnukleotidaustauschfaktor für die Rho-GTPase Cdc42 (Rossman *et al*, 2005). Bemerkenswert ist in diesem Fall, dass sowohl das differentielle Spleißen als auch die entstehende Domänenarchitektur der Varianten von Intersectin im humanen System konserviert sind (Hussain *et al*, 1999).

Die Vermutung, dass Variation durch alternatives Spleißen vor allem in höheren Organismen bedeutend ist, resultiert primär aus Arbeiten an dem Modellsystem *S. cerevisiae*, dessen Gene nur wenige Introns aufweisen (Goffeau *et al*, 1996). Reguliertes Spleißen hat aber auch in *S. cerevisiae* eine wichtige Funktion, beispielsweise bei der Bildung von Meiose-spezifischen Proteinen (Juneau *et al*, 2007). Die Duplikation des gesamten Genoms könnte eine Begründung dafür sein, dass in *S. cerevisiae* bisher jedoch keine durch differentielles Spleißen hervorgerufenen Proteinvarianten entdeckt wurden (Wolfe *et al*, 1997). Beispielsweise codieren in *S. cerevisiae* jeweils mehrere Gene für Isoformen von Malatdehydrogenasen oder NADP abhängigen Isocitratdehydrogenasen mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisierung, während in anderen Pilzen entsprechende Varianten dieser Enzyme von einem Gen aus gebildet werden (Haselbeck & McAlister-Henn, 1991; Henke *et al*, 1998; Kabran *et al*, 2012; McAlister-Henn *et al*, 1995; Minard & McAlister-Henn, 1991; Szewczyk *et al*, 2001). Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Translationsregulatoren Ski7 und Hbs1 in *S. cerevisiae* und *S. pombe* von zwei Genen aus gebildet werden, während in anderen mit der Bäckerhefe eng verwandten Pilzen alternatives Spleißen eines Transkripts zur Bildung der beiden Regulatoren führt (Marshall *et al*, 2013).

Auch in dieser Arbeit konnten keine peroxisomalen Varianten von GAPDH oder PGK in *S. cerevisiae* und *S. pombe* entdeckt werden, die durch alternatives Spleißen entstehen. Interessanterweise besitzt *S. cerevisiae* jedoch drei Gene, die für Enzyme mit GAPDH-Funktion (www.yeastgenome.org: Tdh1, Tdh2, Tdh3) codieren (McAlister & Holland, 1985). Bisher wurde jedoch für keines der drei Enzyme eine Lokalisierung in den Peroxisomen beschrieben. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die Regulation dieser Gene den Stoffwechsel in ähnlicher Weise beeinflussen kann wie die Kompartimentierung der Enzyme in Peroxisomen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass bestimmter Stress (z. B. die stationäre Phase) zur differentiellen Regulation der drei GAPDH codierenden Gene aus *S. cerevisiae* führt (Bouchérié *et al*, 1995).

Aus allen diesen Daten lässt sich ableiten, dass in *S. cerevisiae* womöglich aufgrund der Duplikation des Genoms oder der Duplikation einzelner Gene identische Enzymfunktionen, die an unterschiedlichen Orten in der Zelle bzw. unter bestimmten Stressbedingungen benötigt werden, vornehmlich aus Produkten verschiedener Gene hervorgehen. Im Gegensatz dazu werden in anderen einzelligen Pilzen zur Expression der entsprechenden Enzyme mit unterschiedlicher Lokalisierung tendenziell Mechanismen wie alternatives Spleißen, das Überlesen von Stopcodons oder auch alternative Transkriptionsstartpunkte verwendet (Szewczyk *et al.*, 2001).

Allerdings erscheint alternatives Spleißen in höheren Eukaryoten im Vergleich mit alternativem Spleißen in Pilzen weitaus komplexer reguliert zu sein. In höheren Eukaryoten werden die verwendeten Exons markiert und eine beträchtliche Zahl unterschiedliche Transkripte wird häufig ausgehend von einer prä-mRNA gebildet, z. B. indem Exons alternativ zusammengesetzt werden (Keren *et al.*, 2010; Matlin *et al.*, 2005). In den hier identifizierten alternativen Spleißvarianten, die für unterschiedlich lokalisierte glykolytische Enzyme codieren, kommt es hingegen aufgrund einer Kombination von alternativem Spleißen mit alternativer Polyadenylierung zu mehreren Isoformen. Alternativ werden die Introns durch die Benutzung alternativer 5'Spleißstellen bzw. 3'Spleißstellen verlängert oder verkürzt.

Es ist bisher ungeklärt, ob das Verhältnis der Isoformen glykolytischer Enzyme konstant ist oder einer Regulation unterliegt. In der Mehrzahl der untersuchten Pilze dienen unterschiedliche Mechanismen der Generierung der peroxisomalen Isoformen von GAPDH und PGK (alternatives Spleißen und das Überlesen von Stopcodons). Wenn die peroxisomale Lokalisierung von GAPDH und PGK gemeinsam reguliert wird, müsste eine Co-Regulation von Spleißen und dem programmierten Überlesen des Stopcodons stattfinden.

3.2 Gezieltes Überlesen von Stopcodons zur Erzeugung alternativer Isoformen

Das Überlesen eines Stopcodons, das für die Herstellung peroxisomaler Isoformen von PGK und TPI aus *U. maydis* aber auch von einigen GAPDH-Homologen aus Ascomyceten verwendet wird, ist in Eukaryoten ein bisher nur wenig charakterisierter Mechanismus zur Erzeugung alternativer Proteinvarianten. Vor allem in RNA-Viren ist das gezielte Überlesen von Stopcodons verbreitet, um die Varianz von Proteinen zu erhöhen, die ausgehend von

einer mRNA hergestellt werden können (Baranov *et al.*, 2002; Dam *et al.*, 1990). Für das effiziente Überlesen eines Stopcodons ist häufig die Sequenz in direkter Nachbarschaft des Stopcodons und teilweise zusätzlich noch die Ausbildung einer Sekundärstruktur in der 3'UTR oder auch stromaufwärts des Stopcodons entscheidend (Bertram *et al.*, 2001). Bei den Experimenten in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Sequenzbereich stromabwärts des Stopcodons für die Synthese einer verlängerten Isoform der PGK in *U. maydis* benötigt wird. In diesem Bereich bildet sich laut Vorhersage auch eine Sekundärstruktur. Eine genauere Untersuchung dieses Sequenzbereichs mit Hilfe von Trunktationsanalysen ergab jedoch sowohl im Fall von *pgk1* als auch im Fall von *tpi1*, dass der Bereich mit vorhergesagter Sekundärstruktur für das Überlesen des Stopcodons nicht unbedingt benötigt wird, sondern möglicherweise nur dessen Effizienz erhöht (Alina Stiebler & Johannes Freitag, unveröffentlichte Daten). Für das Überlesen der Stopcodons von *tpi1* bzw. *pgk1* waren drei bzw. fünf stromabwärts liegende Nukleotide ausreichend. In beiden Genen endet der Leserahmen auf das Stopcodon TGA, auf das die sehr ähnlichen Sequenzmotive CTCGA (*pgk1*) bzw. CTAGC (*tpi1*) folgen. Die Nukleotide vor dem Stopcodon unterscheiden sich bei den beiden Genen hingegen deutlich. Interessanterweise ist in dem nah verwandten Pilz *S. reilianum* nur das Sequenzmotiv hinter dem Stopcodon von *tpi1* (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/sporisorium;sr14299>) konserviert, während die Sequenz hinter dem Stopcodon von *pgk1* (*sr15784*) deutlich abweicht (ATCGC). In Viren kann das Überlesen eines Stopcodons TGA durch die Sequenz CTC stromabwärts des Stopcodons ausgelöst werden, die exakt hinter dem Stopcodon von *pgk1* aus *U. maydis* auftritt (Leng *et al.*, 1998; Li & Rice, 1993). Das Sequenzelement CTA hinter dem Stopcodon TGA wurde auch im humanen System mit ineffizienter Translationstermination in Verbindung gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass der Sequenzkontext TGACTA überlesen wird und damit einen letalen Phänotyp supprimieren kann, der durch eine „nonsense“-Mutation hervorgerufen wird (Pacho *et al.*, 2011).

Im Unterschied zu *U. maydis* und *S. reilianum* entstehen die peroxisomalen Isoformen der GAPDH in den untersuchten Ascomyceten durch das Überlesen von Stopcodons. Die Stopcodons der GAPDH Transkripte und deren Kontext erscheinen dabei kaum konserviert zu sein (siehe Abb. A1). Zum Beispiel endet das GAPDH codierende Gen *gpd1* aus dem filamentösen Ascomyceten *N. crassa* auf das Stopcodon TAA. In Untersuchungen des peroxisomalen Proteoms von *N. crassa* konnten sowohl GAPDH als auch PGK als peroxisomale Proteine ohne PTS1-Motiv identifiziert werden (Managadze *et al.*, 2010). Beide Enzyme aus *N. crassa* besitzen jedoch vermutlich PTS1-Motive, die vom Überlesen des

ersten Stopcodons bzw. von alternativem Spleißen herrühren. Das potentiell überlesene Stopcodon TAA von *gpd1* wird von den Sequenzen AGGCT und ATCGG eingerahmt. Ein derartiger Sequenzkontext wurde noch nicht mit ineffizienter Termination bzw. dem Überlesen von Stopcodons in Verbindung gebracht. Allerdings wurde für das Stopcodon TAA bereits nachgewiesen, dass es in Eukaryoten effizient überlesen werden kann. In der Taufliege *Drosophila melanogaster* löst die ineffiziente Termination an einem UAA-Codon der *hdc* (*headcase*) mRNA die Bildung eines Inhibitors für die Verzweigung von Tracheen aus (Steneberg *et al*, 1998). Die Synthese dieses Inhibitors hängt von der Ausbildung einer Sekundärstruktur im 3'Bereich des Stopcodons ab (Steneberg & Samakovlis, 2001). Darüber hinaus sind zwei weitere Gene aus *D. melanogaster* gut charakterisiert, deren Stopcodons effizient überlesen werden (Klagges *et al*, 1996; Robinson & Cooley, 1997).

Lange waren in Eukaryoten neben den genannten Beispielen nur drei andere Gene bekannt, bei denen das Überlesen der Stopcodons zur Herstellung alternativer Isoformen führt. In Kaninchen wird durch das Überlesen eines Stopcodons eine verlängerten Isoform von β -Globin hergestellt und in *S. cerevisiae* konnten ebenfalls zwei Gene identifiziert werden, deren Stopcodons häufig überlesen werden und zur Bildung alternativer Proteine führen (Chittum *et al*, 1998; Namy *et al*, 2002, 2003). In der Bäckerhefe und in anderen Organismen führen zudem bestimmte Suppressor-Stämme, die die Wirkung vorzeitiger Stopcodons in essentiellen Genen unterdrücken können, zum Überlesen der Stopcodons etlicher Gene. In einer Arbeit zur Evolution und biologischen Funktion des Prions Sup35 aus *S. cerevisiae* wird diskutiert, dass das durch Sup35 ausgelöste Überlesen von Stopcodons die Variabilität einer Population erhöht und so einen potentiellen Selektionsvorteil hervorruft (True & Lindquist, 2000).

Die Sequenzierung und genauere vergleichende Analyse der Genome einiger *Drosophila* Arten führte jedoch zu der Erkenntnis, dass wahrscheinlich das gezielte Überlesen von Stopcodons häufiger auftritt, als zuvor vermutet wurde (Clark *et al*, 2007; Stark *et al*, 2007). In einer systematischen Suche konnten über 250 Kandidatengene identifiziert werden, in denen das Überlesen des Stopcodons möglicherweise in den verschiedenen sequenzierten *Drosophila* Arten konserviert ist (Jungreis *et al*, 2011). Zudem konnten diese Autoren zeigen, dass im Fall des durchlässigen Stopcodonkontext TGAC Sekundärstrukturen sowohl in der 3'UTR als auch stromaufwärts des Stopcodons relativ selten sind und eher bei den weniger durchlässigen Stopcodons TAG und TAA vorkommen. Dies spricht dafür, dass auch im Fall von *tpi1* und *pgk1* aus *U. maydis* womöglich keine Sekundärstrukturen benötigt werden, da beide das Stopcodon TGA aufweisen. Ob eine Sekundärstruktur jedoch bei einigen der

anderen untersuchten Gene aus Pilzen von Bedeutung ist, muss noch genauer untersucht werden. Außerdem ist noch zu klären, ob beim Überlesen der Stopcodons von GAPDH, PGK und TPI codierenden Transkripten eine Aminosäure inseriert wird oder diese Codons übersprungen werden, was ebenfalls vereinzelt beobachtet werden konnte (Baranov *et al*, 2002; Bertram *et al*, 2001).

Die weite Verbreitung von verlängerten peroxisomalen Isoformen glykolytischer Enzyme in Pilzen zeigt, dass in dieser Gruppe von Organismen, aber womöglich auch darüber hinaus, das programmierte Überlesen von Stopcodons keine Randerscheinung und für die Herstellung alternativer Isoformen mit C-terminalem PTS1-Motiv gut geeignet ist. Eine genaue Charakterisierung der Sequenzelemente bzw. der strukturellen Motive, die verantwortlich für das Überlesen der Stopcodons bei den in dieser Arbeit untersuchten Genen sind, könnte die Entdeckung weiterer verlängerter Isoformen mit PTS1 ermöglichen.

3.3 Ein erweitertes peroxisomales Proteom bedingt durch die duale Lokalisierung von Proteinen und ungewöhnliche PTS1-Motive

3.3.1 Mechanismen zur dualen Lokalisierung von Proteinen

Während dieser Arbeit wurden, neben den bisher diskutierten Mechanismen der alternativen mRNA-Prozessierung bzw. der ineffizienten Termination der Translation, Proteine mit PTS1-Motiven identifiziert, die nicht ausschließlich in den Peroxisomen lokalisieren, sondern zum Teil oder sogar überwiegend im Zytoplasma lokalisiert sind. Die N-terminalen GFP-Fusionsproteine von Gpd1 und GAPDH_{per} aus *U. maydis* befanden sich trotz PTS1 teilweise im Zytoplasma, während das typische peroxisomale Protein Pte1 ausschließlich in den Peroxisomen zu finden war. Die einfachste Erklärung ist, dass die beiden PTS1-Motive entgegen der Vorhersage *in vivo* ineffizient sind und so keinen vollständigen Import hervorrufen. Außerdem ist bekannt, dass die GAPDH in Prokaryoten und Eukaryoten Tetramere bildet, was den Import in Peroxisomen möglicherweise erschweren bzw. die Zugänglichkeit von Pex5 zum PTS1 behindern könnte (Skarzynski *et al*, 1987; Vellieux *et al*, 1993). Da jedoch auch Oligomere in Peroxisomen importiert werden können, ist jedoch auch vorstellbar, dass Komplexe mit Untereinheiten mit und ohne PTS1 in die Peroxisomen gelangen (Glover *et al*, 1994). Die Glycerol-3-phosphat Dehydrogenase Gpd1 aus *S. cerevisiae* wird in der Nähe des PTS-Motivs phosphoryliert und so der Import in die

Peroxisomen verhindert (Jung *et al*, 2010). Eine derartige posttranslationale Modifikation könnte ebenfalls die duale Lokalisierung von Gpd1 in *U. maydis* begründen.

Neben GAPDH, PGK und TPI besitzen auch noch die FBA und die PEPCK aus *U. maydis* funktionelle PTS1-Motive. Allerdings war es bisher nicht möglich die partielle peroxisomale Lokalisation der Vollängenproteine zu beobachten (Ergebnisse dieser Arbeit; Julia Ast, persönliche Mitteilung). Ob die untersuchten Proteine gar nicht oder nur zum Teil in den Peroxisomen lokalisieren, wird derzeit untersucht. In manchen Proteinen haben PTS1-Motive keine Wirksamkeit, die isoliert peroxisomalen Import vermitteln können (Kohlwein *et al*, 2013). Eine duale Lokalisation von FBA und PEPCK im Peroxisom und im Zytoplasma erscheint jedoch nicht unwahrscheinlich, da beide Enzyme in funktioneller Beziehung zu den bereits im Peroxisom identifizierten Enzymen der Glykolyse/Gluconeogenese stehen. Die FBA katalysiert sogar direkt die Reaktion, die Substrate für GAPDH und TPI zur Verfügung stellt oder verbraucht. Ferner wurden die FBA und auch die TPI in einer Studie des peroxisomalen Proteoms des Ascomyceten *P. chrysogenum* in den Peroxisomen gefunden (Kiel *et al*, 2009).

Demnach bewirken in *U. maydis* und auch in weiteren Pilzen mindestens drei unterschiedliche Mechanismen die duale Lokalisierung von Proteinen in Peroxisomen und im Zytoplasma (Abb. 39). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass alternative Transkriptionsstarts zur differentiellen Lokalisierung der NADP abhängigen Isocitratdehydrogenase (Idp) aus *A. nidulans* in Peroxisomen, dem Zytoplasma und zusätzlich noch den Mitochondrien führt (Abb. 39; Szewczyk *et al*, 2001). Eine potentielle NADP abhängige Isocitratdehydrogenase (Um06111) aus *U. maydis* hat ebenfalls ein funktionelles PTS1-Motiv und die differentielle Lokalisierung dieses Proteins wird durch alternative Transkriptionsstarts und alternatives Spleißen determiniert (Julia Ast, persönliche Mitteilung). Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich eine Reihe von Proteinen sowohl in Mitochondrien als auch in Chloroplasten befindet, obwohl sie vom selben Gen codiert sind. Vergleichbar mit den im vorherigen Teil beschriebenen peroxisomalen Proteinen können alternative Transkriptionsstarts, Translationsstarts oder alternatives Spleißen die Ausbildung von zwei Isoformen bedingen, die eine N-terminale Zielsteuerungssequenz für entweder Mitochondrien oder Chloroplasten beinhalten (Peeters & Small, 2001). Einige Lokalisierungssignale ermöglichen sogar den Import in beide Organellen (Akashi *et al*, 1998; Menand *et al*, 1998).

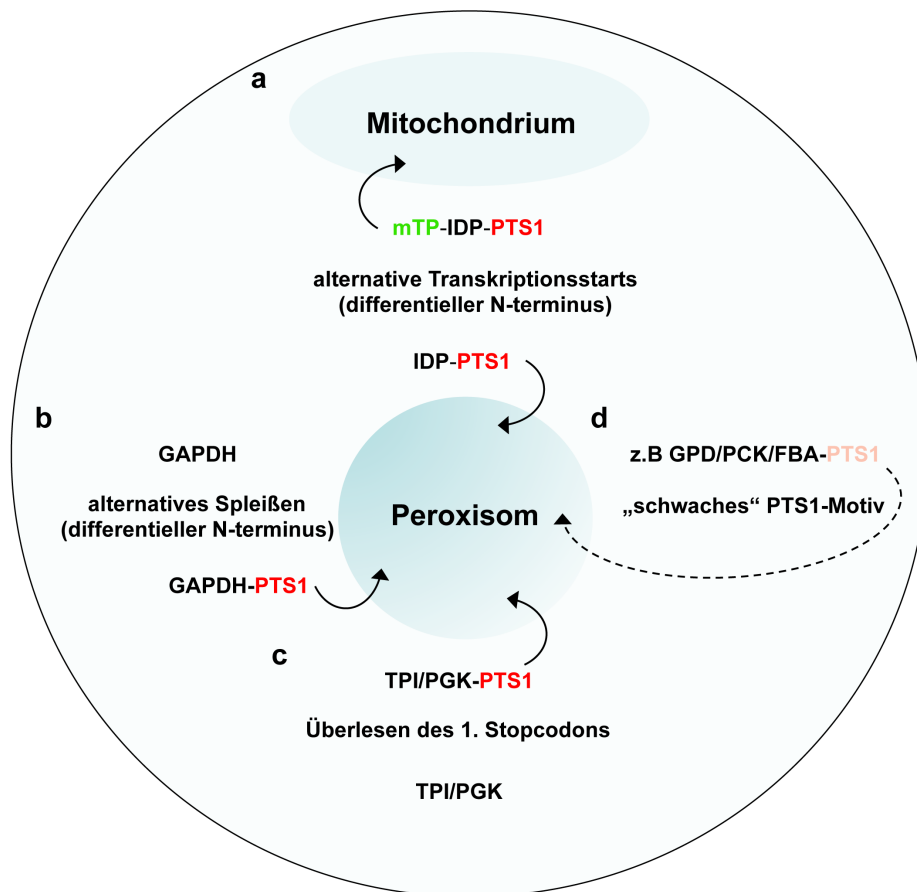


Abbildung 39: Verschiedene Mechanismen führen in *U. maydis* zur differentiellen Lokalisierung von Proteinen in Peroxisomen und andere Kompartimente

a; Die NADP-abhängige Isocitratdehydrogenase lokalisiert abhängig von zwei unterschiedlichen Transkriptionsstarts in *A. nidulans* entweder in Mitochondrien, dem Zytoplasma oder in Peroxisomen (Szewczyk *et al.*, 2001). Dies scheint in *U. maydis* konserviert zu sein (Julia Ast, persönliche Mitteilung). mTP = „mitochondrial matrix-targeting signal“

b und c; Durch alternatives Spleißen und dem programmierten Überlesen des ersten Stopcodons können am C-Terminus verlängerte Proteine gebildet werden, die in den Peroxisomen lokalisieren können.

d; Manche Proteine mit funktionellen PTS1-Motiven lokalisieren nur zum Teil in den Peroxisomen. Der Ausdruck „schwache“ PTS1-Motive ist eine Vereinfachung und bezieht sich auf Proteine, die trotz konstitutivem PTS1-Motiv nur teilweise in den Peroxisomen zu finden sind.

Die Mechanismen zur Lokalisierung von Proteinen, die sich in Mitochondrien und noch mindestens in einem anderen Kompartiment befinden, sind besonders gut untersucht worden (Yogev & Pines, 2011). Beispielsweise lokalisiert humanes Renin neben den Mitochondrien noch im ER und die Endonuklease Apn1 aus *S. cerevisiae* lokalisiert durch die Maskierung des Kernlokalisierungssignals im Zytoplasma und den Mitochondrien anstelle des Zellkerns (Clausmeyer *et al.*, 1999; Vongsamphanh *et al.*, 2001). Für die Fumarase aus *S. cerevisiae* wurde sogar der Rücktransport von Mitochondrien ins Zytoplasma dokumentiert (Knox *et al.*, 1998; Stein *et al.*, 1994). Die Fumarase katalysiert in Mitochondrien eine Reaktion des Krebs-Zyklus (Voet *et al.*, 2010). Im Zytoplasma hat die Fumarase eine vollkommen andere Funktion und wird bei DNA-verändernden Bedingungen in den Zellkern transportiert, wo die

Bildung von Fumarat der Akkumulation von DNA-Doppelstrangbrüchen entgegen wirkt (Yogev *et al.*, 2010). Dual lokalisierte Proteine haben jedoch manchmal auch vergleichbare Funktionen in verschiedenen Organellen (Yogev & Pines, 2011). Beispielsweise spielt das humane Protein hFis1 eine Rolle bei der Teilung von Mitochondrien und Peroxisomen und lokalisiert Pex19 abhängig in der peroxisomalen Membran (Delille & Schrader, 2008; Koch *et al.*, 2005).

Die überraschende Identifizierung von glykolytischen Enzymen in den Peroxisomen von Pilzen ist ein Hinweis darauf, dass das peroxisomale Proteom weitere dual lokalisierte Proteine beinhalten könnte, die in bisherigen Untersuchungen nicht aufgefallen sind. Mit der Ausnahme von Trypanosomen wurde die Glykolyse bisher nicht mit Peroxisomen in Verbindung gebracht, sondern galt als zytoplasmatisch bzw. in Pflanzen teilweise oder sogar ausschließlich in den Chloroplasten lokalisiert (Michels *et al.*, 2006; Plaxton, 1996; Voet *et al.*, 2010). Bei der Suche nach weiteren peroxisomalen Proteinen in *U. maydis* fiel auf, dass auch beide Untereinheiten der NADH abhängigen Isocitratdehydrogenase (Krebs-Zyklus; Um01328, Um01329) und eine Pyruvatcarboxylase (Gluconeogenese, Um11593) über funktionelle PTS1-Motive verfügen (Julia Ast & Johannes Freitag, unveröffentlichte Daten). Der Nachweis dual lokalisierter Proteine ist oftmals schwierig, da solche Proteine in Proteomstudien als Kontamination eingestuft werden können. Vergleichbare dual lokalisierte Proteine wurden in den Mitochondrien schon mithilfe der LacZ α -Komplementation sichtbar gemacht (Karniely *et al.*, 2006). Dieser oder ein vergleichbarer Ansatz wie die Nutzung selbst assemblierender GFP-Fragmente könnte besonders für die Charakterisierung von teilweise peroxisomal lokalisierten Proteinen hilfreich sein (Cabantous *et al.*, 2004).

3.3.2 Ungewöhnliche PTS1-Motive

In Proteom-Studien der Peroxisomen aus *S. cerevisiae* bzw. aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* konnten 57 bzw. 17 bis dahin unbekannte peroxisomale Proteine identifiziert werden, die zum Teil auch durch ungewöhnliche PTS1-Motive auffielen (Marelli *et al.*, 2004; Reumann *et al.*, 2007). In weiteren Arbeiten wurde deutlich, dass *A. thaliana* eine Vielzahl von Proteinen funktionelle PTS1-Motiven aufweisen, die stark vom gültigen Konsensus abweichen und zum Teil Rückschlüsse auf neuartige metabolische Funktionen der Peroxisomen ermöglichten (Lingner *et al.*, 2011; Reumann *et al.*, 2009). Einige dieser ungewöhnlichen Tripeptide (z. B. SSL und ASL) vermittelten auch in Pilzen peroxisomalen Import von fluoreszierenden Proteinen und befinden sich am C-Terminus peroxisomaler

Isoformen von GAPDH bzw. PGK. Des Weiteren wurden im Verlauf dieser Arbeit andere ungewöhnliche PTS1-Motive gefunden, die sogar zum vollständigen peroxisomalen Import von fluoreszierender Proteine führten (z. B. SVL und GNL). Daher ist der Konsensus für PTS1-Motive auch in Pilzen vermutlich weitaus degenerierter als bisher angenommen wurde. Folglich müssen bei bioinformatischen Untersuchungen auch sehr abweichende Motive als PTS1 in Betracht gezogen werden.

3.4 Mögliche Funktionen der peroxisomalen Isoformen glykolytischer/ gluconeogenetischer Enzyme in Peroxisomen von Pilzen

3.4.1 Die peroxisomale Isoform von GAPDH als Teil eines Redox-Shuttles

Für die peroxisomale β -Oxidation von Fettsäuren ist die Regenerierung von oxidiertem NAD^+ essentiell (Poirier *et al*, 2006). Da die peroxisomale Membran impermeabel für NADH ist, gibt es Mechanismen, um in Peroxisomen NAD^+ wieder zur Verfügung zu stellen (Van Roermund *et al*, 1995; Visser *et al*, 2007). In *S. cerevisiae* ist die Mdh3 notwendig für diese Regenerierung von NAD^+ und Deletionsmutanten sind nicht in der Lage auf Fettsäuren zu wachsen (Van Roermund *et al*, 1995). Oxidiertes NAD^+ wird folglich beim Wachstum auf Fettsäuren mithilfe von membrangängigen Intermediaten (Malat/Oxalacetat) gegen NADH ausgetauscht (Redox-Shuttle).

Die Deletion der Sequenz von *gapd* aus *U. maydis*, die für das PTS1-Motiv codiert, führte zur einer Verringerung der Virulenz, hatte jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das Wachstum auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. Allerdings führte die Mutation der PTS1-Motive anderer NAD abhängiger peroxisomaler Dehydrogenasen (Mdh1, Gpd1) in *gapd* Δ PTS1 Mutanten zu synthetischen Wachstumsdefekten. Zellen, in denen die peroxisomale Lokalisation aller drei Dehydrogenasen verhindert wurde, hatten den stärksten Wachstumsphänotyp, waren aber noch immer in der Lage, Glucose und Ölsäure als Kohlenstoffquelle zu verwerten. Interessanterweise war der Wachstumsdefekt dieser Mutanten auf Glucose-Medium sehr ähnlich zum Defekt einer Δ pex6 Mutante. GAPDH könnte also in ähnlich wie die Mdh3 aus *S. cerevisiae* das Verhältnis von NADH/NAD^+ kontrollieren, ist dafür jedoch nicht essentiell, sondern kann von anderen Dehydrogenasen ersetzt werden. Die peroxisomale Lokalisierung einer Malatdehydrogenase ist in der Hefe

Y. lipolytica ähnlich wie in *U. maydis* auch nicht für den Ölsäure Katabolismus notwendig (Kabran *et al*, 2012). Diese Autoren vermuten, dass die peroxisomale Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase das Fehlen der peroxisomalen Malatdehydrogenase kompensieren könnte. Eine Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase ist in Tieren ebenfalls in den Peroxisomen lokalisiert (Gee *et al*, 1974). Da jedoch in *U. maydis* auch die gleichzeitige Mutation der PTS1-Motive von Mdh1, Gpd1 und GAPDH nicht zum totalen Verlust der peroxisomalen β -Oxidation führte, muss es alternative Wege geben, um NAD^+ in den Peroxisomen zu regenerieren. *U. maydis* enthält keine peroxisomale NAD abhängige Lactatdehydrogenase, die in Tieren ebenfalls für den Austausch von reduziertem NADH und oxidiertem NAD^+ verantwortlich sein könnte (Visser *et al*, 2007). Jedoch besitzt die aus zwei ähnlichen Untereinheiten bestehende NAD abhängige Isocitratdehydrogenase ein ähnliches Potential und weist in *U. maydis* funktionelle PTS1-Motive auf (Baumgart *et al*, 1996; McClelland *et al*, 2003; Visser *et al*, 2006; Julia Ast & Johannes Freitag, unveröffentlichte Daten).

Redox-Shuttlesysteme kontrollieren das Verhältnis von NADH und NAD^+ , sind jedoch nicht dazu befähigt Redoxäquivalente in Organellen zu importieren. Erst vor kurzem konnte in Pflanzen ein Transporter identifiziert werden, der Ähnlichkeiten zum peroxisomalen ATP-Transporter Ant1 aus der Bäckerhefe aufweist, jedoch NAD^+ transportieren kann (Bernhardt *et al*, 2012; Palmieri *et al*, 2001; van Roermund *et al*, 2001). Auch im Genom von *U. maydis* sind vier ähnliche Proteine (Um01257, Um04444, Um01782 und Um00919) codiert, die entweder einzeln oder gemeinsam die Versorgung der Peroxisomen mit den Cofaktoren NADH und ATP gewährleisten könnten. Ob diese möglichen NADH Transporter als Antiporter funktionieren und damit ähnlich einem „Shuttle“ auch die Ratio von NADH/ NAD^+ beeinflussen können, ist derzeit noch nicht bekannt. Es konnte gezeigt werden, dass zumindest ein sehr langsamer Austausch von NADH/ NAD^+ über die Membran von Peroxisomen aus der Rattenleber stattfindet (Antonenkova *et al*, 2004).

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass die bisher charakterisierten peroxisomalen NADH abhängigen Dehydrogenasen zwar wahrscheinlich die Homöostase von NADH in den Peroxisomen beeinflussen können, aber keine essentielle Bedeutung für den peroxisomalen Stoffwechsel haben. Sie könnten z.B. als Puffer unter veränderten Stoffwechselbedingungen fungieren und schnelle Änderungen in der Ratio von NADH zu NAD^+ kompensieren.

Die PGK könnte an der Kontrolle des Verhältnisses von ATP/ADP in den Peroxisomen beteiligt sein (Abb. 40). Es sind im Menschen und der Bäckerhefe zwei Enzyme beschrieben worden, die ATP in Peroxisomen benötigen (Antonenkova & Hiltunen, 2012). Die peroxisomale Lon-Protease wird vermutlich für den Abbau ungefalteter Proteine benötigt,

während VLCASs („Very Long-Chain Acyl-CoA Synthase, Ratte) bzw. LCASs (Long-Chain Acyl-CoA Synthase, Bäckerhefe) die ATP abhängige Aktivierung von Fettsäuren katalysieren können (Aksam *et al*, 2007; Hettema *et al*, 1996; Lazo *et al*, 1990; Lewin *et al*, 2002; Kikuchi *et al*, 2004). Für die Versorgung der Peroxisomen mit ATP wurden bisher nur Transporter beschrieben und keine Shuttle-Systeme, die wie die in dieser Arbeit identifizierte peroxisomale PGK durch die Richtung ihrer Reaktion die Ratio von ATP/ADP in den Peroxisomen modifizieren könnten (Palmieri *et al*, 2001; Visser *et al*, 2002).

3.4.2 Glykolyse oder „Moonlighting“

Bisher konnte nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass glykolytische Enzyme in Peroxisomen von Pilzen eine vom Zuckerstoffwechsel abweichende oder sogar eine vollkommen neuartige Funktion erfüllen. Von einigen glykolytischen Enzymen weiß man, dass sie abgesehen von ihrer eigentlichen Rolle bei der Glykolyse zusätzlich noch vollkommen andere Aufgaben („Moonlighting“) haben können (Huberts & Van der Klei, 2010). GAPDH-Varianten verschiedener Organismen sind im Zellkern an der Kontrolle der Transkription beteiligt, werden ins Periplasma sekretiert, sind mit Tubulin assoziiert, spielen eine Rolle bei der Endozytose bzw. Apoptose und binden an transfer-RNA (Delgado *et al*, 1995, 2001; Egea *et al*, 2007; Ishitani *et al*, 1996; Karkhoff-Schweizer & Knull, 1987; Singh *et al*, 1993; Zheng *et al*, 2003). Die PGK hat ebenfalls Funktionen abseits der Glykolyse und ist z. B. im pflanzlichen Zellkern lokalisiert, während die Enolase sekretiert wird und zusätzlich eine Aufgabe bei der Fusion von Vakuolen hat (Anderson *et al*, 2004; Decker & Wickner, 2006; Edwards *et al*, 2006; Miura *et al*, 2012). Auch Enzyme aus dem Krebs-Zyklus weisen häufig noch alternative Funktionen auf (Sriram *et al*, 2005). Gerade im Falle dieser evolutionär ursprünglichen Enzyme erscheinen also mehrere bis diverse Funktionen keine Seltenheit zu sein (Copley, 2012).

Allerdings konnten im Laufe dieser Arbeit fünf mit der Glykolyse in Verbindung stehende Enzyme identifiziert werden, die PTS1-Motive beinhalten und in der Lage sind, ihre Substrate ineinander umzuwandeln. Sie bilden so ein größeres Netzwerk von Stoffwechselreaktionen in Peroxisomen (Abb. 40). Bei der Reorganisation der Glykolyse aufgrund von verändertem Nährstoffangebot werden in dem Bakterium *Bacillus subtilis* die Homologe der in Peroxisomen von Pilzen befindlichen glykolytischen Enzyme mit der Ausnahme der FBA als Modul reguliert (Buescher *et al*, 2012). Ein derartiger Verbund ist ungewöhnlich für „Moonlighting“ und macht es daher wahrscheinlicher, dass die glykolytischen Enzyme in den

Peroxisomen für die für sie typischen Stoffwechselreaktionen katalysieren. Außerdem wuchsen *U. maydis* Mutanten, die ausschließlich GAPDH oder PGK mit konstitutiven PTS1-Motiven enthielten, auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen vergleichbar mit einem Wildtypstamm (Julia Ast, vorläufige Ergebnisse). Diese Beobachtung spricht ebenfalls dafür, dass sowohl die Glykolyse als auch die Gluconeogenese zum Teil in den Peroxisomen von *U. maydis* ablaufen können.

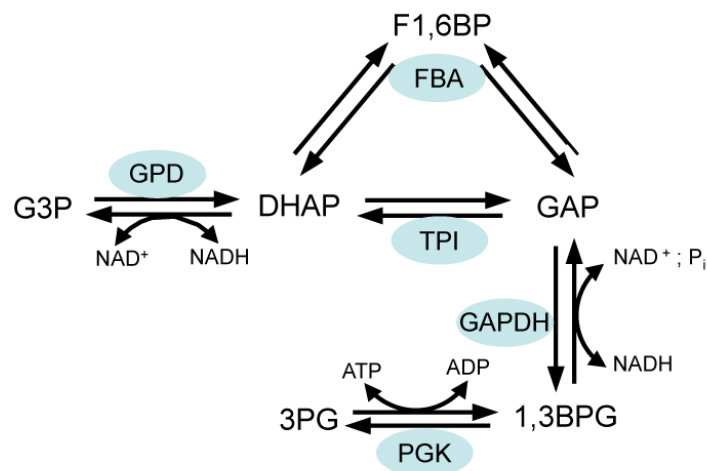


Abbildung 40: Ein neuartiges metabolisches Netzwerk in den Peroxisomen von Pilzen

Die Abbildung zeigt die Gleichgewichtsreaktionen, die von den dual lokalisierten glykolytischen Enzymen (+ GPD) katalysiert werden. ATP und NADH können je nach Richtung verbraucht oder gebildet werden. Das Netzwerk kann abhängig vom Input in beide Richtungen arbeiten.

Fraglich bleibt zu diesem Zeitpunkt allerdings, warum gerade dieser Teil der Glykolyse in vielen Pilzen partiell in den Peroxisomen lokalisiert ist. Der Kompensation einer Turboexplosion der Glykolyse wie Trypanosomen dienen die glykolytischen Enzyme im Peroxisom von Pilzen vermutlich nicht, da die initialen ATP verbrauchenden Reaktionen in Pilzen wahrscheinlich ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert sind und nicht wie in Trypanosomen in den Peroxisomen (Oppendoes & Borst, 1977; Haanstra *et al*, 2008). Genau diese Reaktionen bergen aber die Gefahr von unkontrolliertem ATP-Verbrauch (Turboexplosion) und der übermäßigen Konzentrierung von Phosphat auf glykolytische Intermediate (McKee & McKee, 2009; Teusink *et al*, 1998). Auch eine Beteiligung am Transport der Peroxisomen, wie sie für GAPDH und PGK erst vor kurzem beim Transport von Vesikeln in Neuronen gezeigt wurde, erscheint unwahrscheinlich (Zala *et al*, 2013). In Pilzen werden die glykolytischen Enzyme im Gegensatz zu den neuronalen Vesikeln nicht von außen an die Peroxisomen gebunden, sondern befinden sich innerhalb der Peroxisomen, die sich in Filamenten von *U. maydis* und auch in anderen Organismen jedoch schnell und über sehr lange Strecken entlang der Mikrotubuli bewegen (Rapp *et al*, 1996; Steinberg &

Schuster, 2011). Der Anteil sich bewogender Peroxisomen könnte als eine Art Diffusor für Energie und Metaboliten fungieren.

Da das neuartige peroxisomale Netzwerk glykolytischer Enzyme evolutionär konserviert ist, hat es in Pilzen vermutlich eine wichtige und generelle Funktion. Um zu verstehen, wie die peroxisomale Lokalisierung der glykolytischen Enzyme den Metabolismus verändert, könnten Untersuchungen des metabolischen Flusses durch die Glykolyse besonders hilfreich sein. Mit Hilfe von ^{13}C -markierten Isotopen von Kohlenstoffquellen konnten wichtige generelle Prinzipien des Metabolismus abgeleitet werden (Sauer, 2006). Unter anderem wurde gezeigt, dass Stoffwechselnetzwerke nicht am absoluten Optimum arbeiten, sondern die Möglichkeit eine schnelle Adaptation auf veränderliche Bedingungen ein wichtiges Merkmal ist (Schuetz *et al.*, 2012). Ferner scheint der Fluss durch die Glykolyse als zentraler Stoffwechselweg vornehmlich posttranslational z. B. über Phosphorylierung der beteiligten Enzyme reguliert zu sein (Daran-Lapujade *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2012). Analoge Studien könnten in Anwesenheit oder Abwesenheit peroxisomaler glykolytischer Enzyme oder in Mutanten ohne funktionelle Peroxisomen Aufschluss über die Flussrate durch die Glykolyse geben und die Bedeutung peroxisomaler glykolytischer Reaktionen für den Zuckerstoffwechsel aufklären. An dieser Stelle sei noch angemerkt, dass einige der in dieser Arbeit identifizierten Enzyme mit dualer Lokalisierung miteinander interagieren können (Sullivan *et al.*, 2003; Wojtas *et al.*, 1997). Mögliche Interaktionen würden vermutlich auch den peroxisomalen Import verkürzter Proteine ohne PTS1 erlauben und müssen bei einer detaillierteren Charakterisierung beachtet werden.

3.4.3 Die konstitutiv hohe Zahl von Peroxisomen könnte die duale Lokalisierung glykolytischer Enzyme in vielen Pilzen begründen

Ein offenkundiger Unterschied zwischen *U. maydis* und *S. cerevisiae* ist die Regulation der Anzahl der Peroxisomen. Während in *U. maydis* schon unter Wachstumsbedingungen auf Zucker eine Vielzahl von Peroxisomen in der Zelle vorliegt, sind in *S. cerevisiae* Zellen unter entsprechenden Bedingungen nur sehr wenige Peroxisomen vorhanden und deren Anzahl erhöht sich im Gegensatz zu *U. maydis* in Abhängigkeit von Ölsäure als Kohlenstoffquelle drastisch (Veenhuis *et al.*, 1987; Ergebnisse dieser Arbeit; Julia Ast, persönliche Mitteilung). In filamentösen Ascomyceten wie *A. nidulans* und *N. crassa*, die ebenfalls peroxisomale Isoformen glykolytischer Enzyme enthalten, wurde zwar schon eine Induktion der Peroxisomen durch Ölsäure gezeigt; allerdings enthalten diese Organismen beim Wachstum

auf Zucker eine erheblich höhere Menge an Peroxisomen als die Bäckerhefe und weisen ferner spezialisierte Peroxisomen („Woronin Bodies“) auf (Hynes *et al.*, 2008; Jedd & Chua, 2000; Maggio-Hall & Keller, 2004; Sichting *et al.*, 2003; Valenciano *et al.*, 1996). Zudem ist in vielen Pilzen die Synthese von Biotin und von Siderophoren partiell in den Peroxisomen lokalisiert (Gründlinger *et al.*, 2013; Magliano *et al.*, 2011; Tanabe *et al.*, 2011). Für *S. cerevisiae* gilt beides wiederum nicht. Die Peroxisomen der Bäckerhefe sind demnach extrem auf die Fettsäureoxidation spezialisierte Organellen, während andere Pilze die Peroxisomen für eine größere Zahl von Stoffwechselleistungen verwenden und somit konstitutiv in hoher Anzahl generieren. Die beträchtliche Anzahl von Peroxisomen könnte die Notwendigkeit für die duale Lokalisierung glykolytischer Enzyme in Peroxisomen und dem Zytoplasma verursachen. Da bereits gezeigt werden konnte, dass Peroxisomen für Moleküle mit einer Größe von bis zu 400 Da permeabel sind (Antonenkov & Hiltunen, 2006; Antonenkov *et al.*, 2004), kann man annehmen, dass die meisten löslichen Intermediate, darunter auch die glykolytischen Intermediate, im Zytoplasma und in den Peroxisomen zu finden sind. Unter Bedingungen unter denen Glykolyse stattfindet, würden dann die Peroxisomen einfach für den Zuckerabbau mitbenutzt werden und so das verfügbare Zellvolumen für die Glykolyse schlichtweg erhöhen, besonders in denjenigen Organismen, die konstitutiv eine große Menge Peroxisomen beinhalten.

Einige Ergebnisse meiner Arbeit weisen außerdem daraufhin, dass in *U. maydis* die peroxisomale β -Oxidation auch unter Bedingungen mit Glucose als Kohlenstoffquelle konstitutiv stattfindet und so z. B. die Produktion von Glykolipiden mit Acylresten variabler Länge gewährleistet wird (siehe Abschnitt 3.6). Es ist vorstellbar, dass die Anwesenheit der glykolytischen Reaktionen im Peroxisom eine direkte Kopplung der β -Oxidation an den Zuckerstoffwechsel ermöglicht. Dafür spricht auch, dass in *U. maydis* sowohl die PEPCK als auch eine Pyruvatcarboxylase funktionelle PTS1-Motive aufweisen (Ergebnisse dieser Arbeit; Julia Ast & Johannes Freitag, unveröffentlichte Daten). Schon länger ist bekannt, dass auch Reaktionen des oxidativen Pentosephosphatwegs und des Glyoxylatzyklus in den Peroxisomen vieler Organismen stattfinden können (Antonenkov, 1989; Graham, 2008; Meyer *et al.*, 2011; Strijbis & Distel, 2010; Strijbis *et al.*, 2012). Ob die peroxisomale Lokalisierung glykolytischer Enzyme den zentralen Stoffwechsel generell verändert oder nur in besonderen Situationen nötig wird, bleibt abzuwarten. Die Vielzahl unterschiedlicher Pilze, die peroxisomale Isoformen von GAPDH und PGK aufweisen, deutet jedoch eine Funktion der dual lokalisierten Enzyme unabhängig von einer bestimmten Lebensweise an.

3.5 Peroxisomen haben in *U. maydis* vielfältige Funktionen

3.5.1 Funktionelle Peroxisomen sind entscheidend für die Virulenz von *U. maydis*

Die Abwesenheit funktioneller Peroxisomen führte in *U. maydis* zu einer drastischen Reduzierung der Virulenz. Auch in anderen pflanzenpathogenen Pilzen spielen Peroxisomen eine entscheidende Rolle bei der Infektion ihrer Wirtspflanzen (Kimura *et al*, 2001; Soundararajan *et al*, 2004; Ramos-Pamplona & Naqvi, 2006; Goh *et al*, 2011). In *Colletotrichum lagenarium* führt die Deletion des Homologs von *pex6* schon früh während der Infektion zu Defekten, da sich keine funktionellen Infektionsstrukturen (Appressorien) ausbilden können (Kimura *et al*, 2001). $\Delta pex6$ Mutanten in *U. maydis* waren sogar noch früher in der Infektionsphase gestört und bilden nur eine reduzierte Anzahl von b-abhängigen Hyphen aus.

Welche weiteren Funktionen Peroxisomen während des Lebenszyklus von *U. maydis* erfüllen, wird derzeit genauer untersucht. Dabei ist noch nicht endgültig geklärt, ob der Verlust der peroxisomalen β -Oxidation alleine für den drastischen Pathogenitätsphänotyp der peroxisomalen Mutanten verantwortlich ist. Die Deletion des Gens *mfe2a*, das für ein multifunktionelles Enzym der β -Oxidation codiert, hat in *U. maydis* zwar keine starke Reduzierung der Virulenz zur Folge, führt aber wie die Deletion von *pex6* zum Verlust des Wachstums auf Ölsäure (Klose & Kronstad, 2006; Kretschmer *et al*, 2012). Allerdings konnte gezeigt werden, dass Mfe2a zum Teil überlappende Funktionen mit einer weiteren Isoform des multifunktionellen Enzym (Mfe2b) zeigt (Kretschmer *et al*, 2012). Die Deletion der Gene für beide Enzyme hat erhebliche Auswirkungen auf die Virulenz und das filamentöse Wachstum von *U. maydis*.

Aus anderen Pilzen ist bekannt, dass Peroxisomen auch von der β -Oxidation unabhängige Funktionen erfüllen können. In *M. grisea* wird der PTS2-Rezeptor Pex7 nicht für das Wachstum auf unterschiedlichen Fettsäuren benötigt, eine Deletion des entsprechenden Gens hat allerdings erhebliche Auswirkungen auf die Infektion der Wirtspflanze (Goh *et al*, 2011). In *U. maydis* wird Pex7 ebenfalls nicht für das Wachstum auf Ölsäure benötigt, *pex7*-Mutanten sind jedoch nur leicht in ihrer Virulenz beeinträchtigt (Domenica Martorana, persönliche Mitteilung). Außerdem konnte gezeigt werden, dass in dem filamentösen Ascomyceten *Podospira anserina* die Deletion unterschiedlicher *pex*-Gene den Lebenszyklus

in verschiedenen Entwicklungsstadien stört (Bonnet *et al.*, 2006). Während Pex2 für den Eintritt in die Meiose benötigt wird, sind die PTS1-Rezeptoren dafür nicht notwendig. *pex5* Mutanten sind in diesem Pilz jedoch im sexuellen Zyklus gestört und inhibieren die Bildung von Perithezien.

3.5.2 Peroxisomen spielen in *U. maydis* eine Rolle beim Metabolismus von Zucker

Wie für peroxisomale Mutanten der Ascomyceten *A. nidulans* und *S. cerevisiae* bereits beschrieben, waren auch in *U. maydis* $\Delta pex6$ -Mutanten und $\Delta pex5$ -Mutanten nicht in der Lage Ölsäure als Kohlenstoffquelle zu verwerten (Erdmann *et al.*, 1989; Erdmann & Kunau, 1992; Hynes *et al.*, 2008; der Leij *et al.*, 1993; Voorn-Brouwer *et al.*, 1993; Ergebnisse dieser Arbeit).

Außerdem führte in *U. maydis* die Deletion von *pex6* zusätzlich noch zu reduziertem Wachstum, wenn Prolin oder Glucose als Kohlenstoffquelle angeboten wurden. Es war bereits bekannt, dass z. B. in *A. nidulans* für das Wachstum auf Prolin Enzyme der Gluconeogenese benötigt werden (Hynes *et al.*, 2002, 2007). Interessanterweise besitzen die PEPCK und eine Pyruvatcarboxylase (Um11593) aus *U. maydis* funktionelle PTS1-Motive (Ergebnisse dieser Arbeit; Julia Ast & Johannes Freitag, unveröffentlichte Daten). Auch in anderen Organismen ist die Regulation von Peroxisomen eng mit der Regulation der Gluconeogenese verknüpft (Masters, 1997). Dieser Zusammenhang erscheint auch deshalb sinnvoll, weil unter Bedingungen in denen Glucose produziert werden muss, häufig gleichzeitig Fettsäuren abgebaut werden (z. B. beim Wachstum von Mikroorganismen auf Fettsäuren aber auch bei der Mobilisierung des Speicherfetts bei der Keimung von Samen). Ob tatsächlich ein Teil der Gluconeogenese in Pilzen im Peroxisom stattfindet, oder ob das beim Metabolismus von Prolin potentiell entstehende toxische Glyoxylat (www.genome.jp/kegg/pathway.html) in den Peroxisomen umgesetzt wird, ist derzeit Gegenstand der Untersuchung. Ein Enzym des Glyoxlatzyklus, die Malatsynthase (Um15004; PTS1-Vorhersage: 3,3) ist in *U. maydis* wie in anderen Pilzen vermutlich in den Peroxisomen lokalisiert (Kunze *et al.*, 2002, 2006; Maeting *et al.*, 1999; Tanaka & Ueda, 1993). Die Rolle der Peroxisomen bei der Gluconeogenese ist anscheinend jedoch unabhängig von der peroxisomalen Lokalisierung des zuvor beschriebenen enzymatischen Netzwerks reversibler glykolytischer/gluconeogentischer Reaktionen (Abb. 40), da $\Delta PTS1$ -Mutanten von *gapd* und *pgk1* keinen Wachstumsphänotyp auf Prolin aufwiesen.

Die mögliche Funktion von Peroxisomen bei der Glykolyse wurde bereits im vorherigen Kapitel ausführlich diskutiert. An dieser Stelle sei noch angemerkt, dass es sich bei dem Wachstumsphänotyp von *pex6*-Mutanten auf Glucose-Medium nicht um eine Besonderheit von *U. maydis* handelt, sondern ein vergleichbarer Phänotyp schon bei einer Studie peroxisomaler Mutanten in *C. neoformans* aufgefallen war (Idnurm *et al.*, 2007).

Peroxisomen haben also neben ihrer weit verbreiteten Rolle bei der β -Oxidation von Fettsäuren zumindest in einigen Pilzen noch wichtige Funktionen beim Metabolismus von Zuckern.

3.5.3 *U. maydis* codiert für zwei Pex5-Homologe mit unterschiedlicher Funktion

Schon vor einigen Jahren war aufgefallen, dass einige Basidiomyceten zwei Versionen des PTS1-Rezeptors Pex5 besitzen (Kiel *et al.*, 2006). In *U. maydis* führte die Deletion der beiden zugehörigen Gene (*pex5a* und *pex5b*) zu unterschiedlichen Phänotypen. Während beide Rezeptoren für das Wachstum auf Ölsäure benötigt wurden, hatte die Deletion von *pex5b* zusätzlich noch einen deutlichen Wachstumsdefekt auf Glucose-Medium zur Folge. Außerdem zeigte eine Δ *pex5b* Mutante in Infektionsexperimenten eine weitaus erheblichere Reduzierung der Virulenz als eine Δ *pex5a* Mutante. Ferner waren nur *pex5b* und nicht *pex5a* Mutanten im filamentösen Wachstum gestört. Diese Ergebnisse zeigen, dass die beiden Rezeptoren unterschiedliche Funktionen haben. In *C. neoformans* hat die Deletion des potentiellen Homologs von *pex5a* ebenfalls keine Auswirkungen auf das Wachstum auf Glucose; das potentielle Homolog von Pex5b wurde in diesem Pilz jedoch bisher noch nicht genauer untersucht (Idnurm *et al.*, 2007).

Beide Pex5 Homologe sind in *U. maydis* vermutlich für den Import von Proteinen mit unterschiedlichen PTS1-Motiven verantwortlich. So rief die Deletion von *pex5a* den Verlust des Imports von Proteinen mit eher ungewöhnlichen PTS1-Motiven hervor, während Pex5b für den Import von Proteinen mit eher klassischen PTS1-Motiven wie SKL verantwortlich war (Julia Ast, persönliche Mitteilung; Ergebnisse dieser Arbeit). Zudem wurde festgestellt, dass die beiden Gene *pex5a* und *pex5b* während des Lebenszyklus von *U. maydis* unterschiedlich reguliert werden (Michael Bölker, persönliche Mitteilung).

Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass die differentielle Expression der beiden Rezeptoren in *U. maydis* zu einer Veränderung des peroxisomalen Proteoms in unterschiedlichen Phasen des Lebenszyklus beitragen könnte. Derzeit wird untersucht, welche

Proteine spezifisch durch einen der beiden Rezeptoren importiert werden und welche Auswirkungen dieser differentielle Import auf den Lebenszyklus von *U. maydis* hat.

3.6 Kompartimentierung der Glykolipidsynthese in *U. maydis*

MELs und Ustilaginsäuren werden von *U. maydis* unter Stickstoffmangelbedingungen in großen Mengen produziert (Haskins, 1950; Haskins & Thorn, 1951; Haskins *et al.*, 1955). In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass zwei essentielle Enzyme der MEL-Biosynthese in den Peroxisomen lokalisiert sind. Diese beiden Enzyme, die verantwortlich für die Verknüpfung von Fettsäureresten mit dem Zuckergrundgerüst sind (siehe Abb. 35), enthalten funktionelle PTS1-Motive und lokalisieren vollständig in den Peroxisomen. Auch in *Pseudozyma antarctica*, der für die Gewinnung von MELs in größerem Maßstab verwendet wird und in *S. reilianum* enthalten die potentiellen Homologe beider Proteine (PANT_19d00003, PANT_1900002 (NCBI) und Sr14187, Sr12506) PTS1-Motive (Morita *et al.*, 2013a; Morita *et al.*, 2013b; Schirawski *et al.*, 2010). Auch *A. nidulans* besitzt ähnliche Acyltransferasen mit PTS1-Motiv. Daraus lässt sich ableiten, dass die peroxisomale Lokalisierung der Acyltransferasen für die Herstellung der MELs konserviert ist.

MELs werden von Mac1 und Mac2 mit Fettsäureresten unterschiedlicher Länge verestert (Hewald *et al.*, 2006). Stämme, die Mac1 und Mac2 ohne PTS1-Motiv produzieren, synthetisierten zwar noch MELs, allerdings war die Länge der Fettsäureseitenketten verändert, weit weniger variabel und hatte eine eindeutige Tendenz in Richtung C16 (langer Rest) bzw. C2 (kurzer Rest). In Wildtypzellen mit peroxisomalen Acyltransferasen traten hingegen Seitenketten von C14 und C12 im Fall des langen Rests bzw. C6 und C4 im Fall des kurzen Rests gemeinsam in einem Glykolipid häufiger auf. Im Peroxisom ist die MEL-Synthese vermutlich direkt an die β -Oxidation gekoppelt, was die Bildung der MELs mit variablen Seitenketten hervorruft. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in *P. antarctica* die Inhibierung der β -Oxidation ebenfalls zur Produktion abgewandelter MELs mit weniger variablen Seitenketten führt (Kitamoto *et al.*, 1998).

Auch bei der Herstellung anderer Sekundärmetaboliten wie Penicillin haben Peroxisomen eine wichtige Funktion (Müller *et al.*, 1992; Spröte *et al.*, 2009). Mehrere Enzyme für die Synthese von Penicillin und auch von Cephalosporin lokalisieren in den Peroxisomen (Kiel *et al.*, 2009; Müller *et al.*, 1991; Spröte *et al.*, 2009). Wie bereits erwähnt, findet auch die Synthese von Siderophoren zum Teil in Peroxisomen statt (Gründlinger *et al.*, 2013). Hierbei

bildet *U. maydis* jedoch eine Ausnahme, da die entsprechenden Enzyme keine PTS-Motive beinhalten. Auffällig ist jedoch, dass das Gencluster, das die für die Synthese des Siderophors Ferrichrom A benötigten Enzyme codiert, zusätzlich noch ein Gen für eine Acyltransferase (Um01438) mit potentielltem PTS1-Motiv enthält (Winterberg *et al*, 2010). Interessanterweise hat dieses Enzym deutliche Ähnlichkeiten zu den Acyltransferasen Mac1 und Mac2 aus *U. maydis* (Hewald *et al*, 2006). *um01438* wird auf transkriptioneller Ebene stark abweichend von den anderen Clustergenen reguliert, da seine Expression nicht deutlich auf Eisen reagiert, sondern vor allem in Tumoren stark erhöht ist (Michael Bölker; persönliche Mitteilung).

Generell ist eine Kompartimentierung der Synthese von Sekundärmetaboliten bzw. der Endprodukte in Eukaryoten weit verbreitet. Zur Produktion des Mycotoxins Aflatoxin nutzt *Aspergillus flavus* nicht nur die peroxisomale β -Oxidation, sondern einige der Reaktionen zur Herstellung dieses Gifts finden vermutlich auch in spezialisierten Vesikeln statt (Chanda *et al*, 2009; Maggio-Hall *et al*, 2005). Beim Sekundärmetabolismus der Pflanzen ist Kompartimentierung ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Flavonoide wie etwa Anthocyan akkumulieren in der Vakuole und die zur Synthese benötigten Enzyme sind an der zytoplasmatischen Seite des ER verankert (Burbulis & Winkel-Shirley, 1999; Zhang *et al*, 2006). Die Kompartimentierung dient der effizienten Synthese der Metaboliten und kann im Fall von Toxinen auch die Selbstvergiftung der Organismen verhindern (Deus-Neumann & Zenk, 1984; Roze *et al*, 2011). In *U. maydis* hat die partielle Kompartimentierung der MEL-Synthese noch einen ganz anderen Effekt. Die Menge an Ustilaginsäuren war in Stämmen, die Mac1 und Mac2 im Zytoplasma enthielten im Vergleich mit einem Wildtypstamm deutlich reduziert. Die Fehllokalisation von Mac1 und Mac2 behindert demnach die gleichzeitige Synthese der beiden Lipide. Für die Synthese der Ustilaginsäuren wird die Fettsäuresynthase Fas2 benötigt (Teichmann *et al*, 2007). Die von Fas2 hergestellten kurzen Fettsäuren könnten im Zytoplasma auch für die Herstellung von MELs benutzt werden. Mac1 bzw. Mac2 scheinen zudem den für die Produktion von Ustilaginsäuren benötigten Pool von C16-Fettsäuren im Zytoplasma zu reduzieren. Die Kompartimentierung der Acyltransferasen für die MEL-Herstellung erlaubt also nicht nur die Synthese von MELs mit variablen Seitenketten, sondern ermöglicht die gleichzeitige ungestörte Produktion von zwei unterschiedlichen Glykolipiden (MEL und UA), die ähnliche Substrate verwenden.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien mit Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden vornehmlich von Difco (Augsburg), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen und waren überwiegend von der Qualität p.a..

4.1.2 Antikörper und Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von Fermentas/Thermo Scientific (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (NEB; Frankfurt) bezogen. Zur Amplifikation von DNA wurden die Polymerasen Phusion Hot Start High-Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes/NEB, Frankfurt), KOD Extreme Polymerase (Novagen/Merck, Darmstadt) oder der *Pfu*-Polymerase (Thermo Scientific) verwendet. Dephosphorylierung von DNA erfolgte mit der Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) von Fermentas/Thermo Scientific. Das Auffüllen von einzelsträngiger DNA wurde mit dem Klenow-Fragment (NEB) durchgeführt. RNA bzw. DNA wurde mit der RNase A von AppliChem (Gatersleben) bzw. DNase I von NEB enzymatisch abgebaut. Der Ligation von DNA-Fragmenten diente die T4 DNA Ligase (Roche; Mannheim). Bakterielle bzw. pilzliche Zellwände wurden mit Lysozym (Roche) bzw. Novozym 234 (Novo Nordisc, Kopenhagen) oder Lysing enzymes aus *Trichoderma harzianum* (Sigma-Aldrich) degradiert. Antikörper gegen GFP bzw. α -Tubulin wurden von den Firmen Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg) bzw. Calbiochem/Merck (Darmstadt) bezogen.

4.1.3 Puffer und Lösungen

Für bestimmte Methoden direkt benötigte Puffer sind unter der Beschreibung der jeweiligen Methode aufgeführt. Andere verwendete Standardlösungen und Puffer wurden nach Ausubel *et al*, 1987 oder Sambrook *et al*, 1989 hergestellt. Wenn nötig wurden die verwendeten

Lösungen und Puffer vor ihrer Verwendung für 20 min bei 121°C autoklaviert oder alternativ mit einem Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) von Sarstedt (Nümbrecht) sterilisiert.

4.1.4 Kits

Zur Präparation von Plasmiden in kleinem Maßstab wurde das ZR-Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research, Freiburg) verwendet. In großem Maßstab benötigte Plasmide wurden mithilfe des GenElute HP Maxiprep Kits (Sigma-Aldrich) gereinigt. DNA aus Agarose Gelen wurde mit dem Gel/PCR Fragments Extraction Kit (Avegene, Hamburg) präpariert. Zur Reinigung von RNA diente das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden).

4.1.5 Geräte

Geräte, die direkt für bestimmte Methoden verwendet wurden, sind bei den jeweiligen Methoden aufgeführt. Der Zentrifugation von Reaktionsgefäßen (1,5 und 2 ml) diente eine Heraeus Biofuge pico und der Zentrifugation größerer Reaktionsgefäße (15 und 50 ml) eine Heraeus Multifuge. Der Erwärmung von Reaktionsgefäßen auf eine definierte Temperatur dienten Thermomixer (Eppendorf, Hamburg).

4.1.6 Sonstige Materialien

Blottingpapier (Roth)
Cryo-Röhrchen (Sarstedt)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml, 15 ml, 50 ml; Sarstedt)
Glasperlen (Sigma)
Kunststoff-Küvetten (Sarstedt)
MobiSpin Columns (MoBiTec, Göttingen)
Nylon-Membran (Roth)
Petrischalen (Sarstedt)
Pipettenspitzen (Sarstedt)
PVDF-Membran (Roth)
Sterile Spritzen und Kanülen (Braun, Melsungen)
Sterilfilter (Sarstedt)

4.2 Kultivierung von Mikroorganismen

Alle verwendeten Medien wurden bei 121°C für 20 min autoklaviert.

4.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in dYT-Medium bzw. SOB-Medium ohne Magnesium schüttelnd bei 200 Upm bzw. auf dYT-Festmedium bei 37°C bzw. bei Raumtemperatur. Als Antibiotikum zur Selektion auf Plasmide wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt.

dYT-Flüssigmedium

1,6% (w/v) Trypton-Pepton

1,0% (w/v) Hefeextrakt

0,5% (w/v) NaCl

in H₂O_{bid.}

(Festmedium: 2% (w/v) Bactoagar)

SOB-Flüssigmedium ohne Magnesium

0,5% (w/v) Hefe

2% (w/v) Trypton/Pepton

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

in H₂O_{bid.}

4.2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae Stämme wurden generell bei 30°C inkubiert. Flüssigkulturen wurden bei 200 Upm schüttelnd in YEPD-Medium oder in Synthetic Complete (SC)-Medium angezogen. Um Selektionsbedingungen zu erzeugen, wurde im Fall von Auxotrophie-Markern auf den Zusatz der entsprechenden Aminosäuren oder von Uracil in SC-Medium verzichtet. Festmedien basierten ebenfalls auf SC-Medium bzw. YEPD Medium. Zur Selektion auf Transformationsereignisse wurde außerdem Nourseothricin (clonNAT) in einer Konzentration von 100 µg/ml verwendet. Dauerkulturen wurden nach Zugabe 50% NSY-Glycerin bei -80°C gelagert.

YEPD-Medium

2% (w/v) Pepton

1% (w/v) Hefeextrakt

2% (w/v) Glucose (nach dem Autoklavieren)

in H₂O_{bid.}

(Festmedium: 2% (w/v) Bactoagar)

SC-Medium

0,17% (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o amino acids

0,2% (w/v) Ammoniumsulfat

2% (w/v) Glucose (nach dem Autoklavieren)

0,0147% (w/v) Dropoutmix zusammengesetzt aus: 2 g L-Alanin, 2 g L-Arginin, 2 g L-Asparaginsäure, 2 g L-Asparagin, 2 g L-Cystein, 2 g L-Glutaminsäure, 2 g L-Glutamin, 2 g L-Glycin, 2 g Inositol, 2 g L-Isoleucin, 2 g L-Lysin, 0,2 g p-Aminobenzoesäure, 2 g L-Phenylalanin, 2 g L-Prolin, 2 g L-Serin, 2 g L-Threonin, 2 g L-Valin

0,04% (w/v) L-Histidin

0,01% (w/v) L-Adenin

0,04% (w/v) L-Tryptophan

0,08% (w/v) L-Leucin

0,04% (w/v) Uracil

je nach Selektionsbedingung wurden einzelne dieser Komponenten nicht zugesetzt

(Festmedium: 2% (w/v) Bactoagar)

in H₂O_{bid.}; pH 5,6

4.2.3 Kultivierung von *U. maydis*

U. maydis wurde entweder in YEPS-Flüssigmedium oder YNB-Flüssigmedium bei 28°C und 180 Upm inkubiert. Als Festmedien dienten Potato-Dextrose- (PD) oder YNB-Agar. Zur Selektion wurden die Antibiotika Carboxin (2 µg/ml), Hygromycin (200 µg/ml), Nourseothricin (150 µg/ml) oder Phleomycin (40 µg/ml) eingesetzt. Dauerkulturen wurden nach Zugabe 50% NSY-Glycerin bei -80°C gelagert. Für fast alle Experimente wurden Kulturen aus der logarithmischen Wachstumsphase mit einer OD₆₀₀ zwischen 0,7 und 1 verwendet. Die Ausnahme bilden hier die Kulturen für die Extraktion von Glycolipiden. Hier wurden Kulturen verwendet, die für drei Tage in YNB-Medium (pH 4,5) mit 1% (w/v) Glucose ohne Stickstoffquelle gezogen waren.

YEPS-Medium

1% (w/v) Hefeextrakt

2% (w/v) Pepton

2% (w/v) Saccharose

in H₂O_{bid.}

YNB-Medium

0,17% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids

0,2% Ammoniumsulfat

als Kohlenstoffquellen wurden verwendet: 2% Glucose, 2% Saccharose, 2% Mannose, 2% Fructose, 2% Galaktose, 0,1% Ölsäure

in H₂O_{bid.}; pH = 5,6

(Festmedium: 2% (w/v) Bactoagar)

PD-Festmedium

2,4% Potato Dextrose Broth

2% Bactoagar

in H₂O_{bid.}

(zum Teil + 1% (w/v) Aktivkohle)

NSY-Glycerin

0,8% (w/v) Nutrient Broth

0,1% (w/v) Hefeextrakt

0,5% (w/v) Saccharose

69,6 % (v/v) Glycerin

in H₂O_{bid}**4.2.4 Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Kulturen**

Die optische Dichte von Kulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) oder 550 nm (OD₅₅₀) bestimmt. Dabei wurden Kulturen über einer OD₆₀₀ bzw. OD₅₅₀ von 1 verdünnt, um einen in etwa linearen Zusammenhang von OD zur Zellzahl sicherzustellen. Als Referenz diente nicht bewachsenes Kulturmedium.

4.3 Stämme, Plasmide und Oligonukleotide**4.3.1 *E. coli* Stämme**

Für sämtliche Klonierungen wurde der *E. coli* Stamm Top Ten (Invitrogen, Karlsruhe) mit dem folgenden Genotyp verwendet: F-, *mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, $\Phi80lacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, *deoR*, *recA1*, *araD139*, $\Delta(ara-leu)7697$, *galU*, *galK*, *rpsL*(Str^R), *endA1*, *nupG*.

4.3.2 *S. cerevisiae* Stämme

Alle verwendeten *S. cerevisiae* Stämme waren Derivate von S288c (Mortimer & Johnston, 1986; Euroscarf) mit dem Genotyp MATa; *his3* Δ 1; *leu2* Δ 0; *met15* Δ 0; *ura3* Δ 0 und enthielten zusätzlich GFP-SPS19 (Freitag *et al*, 2012). Dieser Stamm wurde mit Derivaten des Plasmids pCT320 transformiert (siehe Plasmide).

4.3.3 *U. maydis* Stämme

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten *U. maydis* Stämme aufgeführt. Die Stämme wurden überwiegend während dieser Arbeit hergestellt. Einige der Stämme* stammen aus der Zusammenarbeit mit Julia Ast (aus einer von mir betreuten Masterarbeit). Von den Deletionsmutanten wurden in den meisten Fällen drei, aber zumindest zwei unabhängige Mutanten phänotypisch charakterisiert. Bei Stämmen mit *ip*-Locus Integrationen wurde, wenn im Text bemerkt mit Southern Analyse die Häufigkeit der Integration bestimmt.

Tab. 1 *U. maydis* Stämme

Stammbezeichnung	Genotyp	Resistenz	Referenz
Bub8	<i>a2 b4</i>	—	Schulz <i>et al</i> , 1990
SG200	<i>a1::mfa2 bW2 bE1</i>	Phleo ^R	Kämper <i>et al</i> , 2006
FB1	<i>a1 b1</i>	—	Banuett & Herskowitz, 1989
MB215	<i>a2 b13</i>	—	Hewald <i>et al</i> , 2005
Bub8 mCherry-SKL	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 mCherry-SKL GFP-Pte1	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:egfp-ptel]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 mCherry-SKL GFP- GAPDH	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:egfp-gapd]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 mCherry-SKL GFP-GAPDH _{pex}	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:egfp-gapd_{pex}]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 mCherry-SKL GFP-GAPDH _{cyt}	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:egfp-gapd_{cyt}]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 mCherry-SKL GFP-PGK	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:egfp-pgk1]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 mCherry-SKL GFP-PGK _{pex}	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:egfp-pgk1_{pex}]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 mCherry-SKL GFP-PGK _{cyt}	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:egfp-pgk1_{cyt}]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012

Stammbezeichnung	Genotyp	Resistenz	Referenz
Bub8 Δ pex6 mCherry-SKL	<i>a2 b4 Δpex6</i> <i>P_{otef}:mcherry-SKL</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 Δ pex5a	<i>a2 b4 Δpex5a</i>	Nat ^R	diese Arbeit
Bub8 Δ pex5a mCherry-SKL	<i>a2 b4 Δpex5a</i> <i>P_{otef}:mcherry-SKL</i>	Hyg ^R , Nat ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 Δ pex5b	<i>a2 b4 Δpex5b</i>	Nat ^R	Julia Ast, pers. Mitteilung
Bub8 mCherry-SKL Δ pex5b	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>Δpex5b</i>	Hyg ^R , Nat ^R	Julia Ast, pers. Mitteilung
Bub8 Δ pex5a Δ pex5b	<i>a2 b4 Δpex5a Δpex5b</i>	Nat ^R , Cbx ^R	diese Arbeit
Bub8 mCherry-SKL Δ pex5a Δ pex5b	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>Δpex5a Δpex5b</i>	Hyg ^R , Nat ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
SG200 mCherry-SKL Δ pex5a	<i>a1::mfa2 bW2 bE1 P_{otef}:mcherry-</i> <i>SKL Δpex5a</i>	Hyg ^R , Nat ^R , Phleo ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
SG200 mCherry-SKL Δ pex5b	<i>a1::mfa2 bW2 bE1 P_{otef}:mcherry-</i> <i>SKL Δpex5b</i>	Hyg ^R , Cbx ^R , Phleo ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
SG200 mCherry-SKL Δ pex5a Δ pex5b	<i>a1::mfa2 bW2 bE1</i> <i>P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>Δpex5a Δpex5b</i>	Hyg ^R , Cbx ^R , Phleo ^R Nat ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
FB1 Δ pex6	<i>a1 b1 Δpex6</i>	Nat ^R	diese Arbeit
SG200 mCherry-SKL Δ pex6	<i>a1::mfa2 bW2 bE1</i> <i>P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>Δpex6</i>	Hyg ^R , Phleo ^R Nat ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 Δ pex6	<i>a2 b4 Δpex6</i>	Hyg ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 gapd Δ PTS1	<i>a2 b4 gapdΔPTS1</i>	Hyg ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
FB1 gapd Δ PTS1	<i>a1 b1 gapdΔPTS1</i>	Hyg ^R	diese Arbeit
Bub8 pgk1 Δ PTS1	<i>a2 b4 pgk1ΔPTS1</i>	Nat ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
FB1 pgk1 Δ PTS1	<i>a1 b1 pgk1ΔPTS1</i>	Nat ^R	diese Arbeit

Stammbezeichnung	Genotyp	Resistenz	Referenz
SG200 <i>gapd</i> ΔPTS1	<i>a1::mfa2 bW2 bE1 gapd</i> ΔPTS1	Hyg ^R , Phleo ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
SG200 <i>pgk1</i> ΔPTS1	<i>a1::mfa2 bW2 bE1 pgk1</i> ΔPTS1	Nat ^R , Phleo ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
SG200 <i>gapd</i> ΔPTS1 <i>pgk1</i> ΔPTS1	<i>a1::mfa2 bW2 bE1</i> <i>gapd</i> ΔPTS1 <i>pgk1</i> ΔPTS1	Hyg ^R , Nat ^R , Phleo ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 <i>mdh1</i> ΔPTS1	<i>a2 b4 mdh1</i> ΔPTS1	Hyg ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 <i>gpd1</i> ΔPTS1	<i>a2 b4 gpd1</i> ΔPTS1	Hyg ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012*
Bub8 <i>gpd1</i> ΔPTS1 <i>mdh1</i> ΔPTS1	<i>a2 b4 gpd1</i> ΔPTS1 <i>mdh1</i> ΔPTS1	Hyg ^R , Nat ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 <i>gapd</i> ΔPTS1 <i>mdh1</i> ΔPTS1	<i>a2 b4 gapd</i> ΔPTS1 <i>mdh1</i> ΔPTS1	Hyg ^R , Nat ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 <i>gapd</i> ΔPTS1 <i>gpd1</i> ΔPTS1	<i>a2 b4 gapd</i> ΔPTS1 <i>gpd1</i> ΔPTS1	Hyg ^R , Nat ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 <i>gapd</i> ΔPTS1 <i>gpd1</i> ΔPTS1 <i>mdh1</i> ΔPTS1	<i>a2 b4 gapd</i> ΔPTS1 <i>gpd1</i> ΔPTS1 <i>mdh1</i> ΔPTS1	Hyg ^R , Nat ^R , Phleo ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 mCherry-SKL GFP- Gpd1	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:egfp-gpd1]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 mCherry-SKL GFP- PTS1 _{Mdh1}	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:egfp-PTS1_{Mdh1}]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012*
Bub8 mCherry-SKL GFP- Tpi _{pex}	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:egfp-tpi_{pex}]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 mCherry-SKL GFP- Tpi _{pex}	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:egfp-tpi_{pex}]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 mCherry-SKL GFP- FBA	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:egfp-fba]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 mCherry-SKL GFP- PTS1 _{FBA}	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:egfp-PTS1_{FBA}]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012*
Bub8 mCherry-SKL GFP- PTS1 _{GAPDH2 (P.b.)}	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:egfp-PTS1_{GAPDH2 (P.b.)}]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012*
Bub8 mCherry-SKL GFP- PTS1 _{PGK1 (H.s.)}	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:egfp-PTS1_{pgk1 (H.s.)}]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012*
Bub8 mCherry-SKL GFP- PTS1 _{PGK2 (H.s.)}	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:egfp-PTS1_{pgk2 (H.s.)}]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012*
Bub8 mCherry-SKL GFP- PTS1 _{PGK1 (B.L.)}	<i>a2 b4 P_{otef}:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[P_{otef}:egfp-PTS1_{pgk1 (B.L.)}]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012*

Stammbezeichnung	Genotyp	Resistenz	Referenz
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{PEPCK}	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[Potef:egfp-PTS1_{PEPCK}]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Julia Ast, pers. Mitteilung
MB215 Δ mac1 Δ mac2	<i>a2 b13 Δmac1 Δmac2</i>	Hyg ^R , Nat ^R	Björn Sandrock, pers. Mitteilung
MB215 Δ mac1 Δ mac2 mac1 mac2	<i>a2 b13 Δmac1 Δmac2</i> <i>ip^R[P_{mac1}:mac1 P_{mac2}:mac2]ip^S</i>	Hyg ^R , Nat ^R , Cbx ^R	diese Arbeit
MB215 Δ mac1 Δ mac2 mac1 Δ PTS1 mac2 Δ PTS1	<i>a2 b13 Δmac1 Δmac2</i> <i>ip^R[Pmac1:mac1ΔPTS1 Pmac2:mac2ΔPTS1]ip^S</i>	Hyg ^R , Nat ^R , Cbx ^R	diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Mac1	<i>a2 b13 Potef:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[Potef:egfp-mac1]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Mac2	<i>a2 b13 Potef:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[Potef:egfp-mac2]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Mac1 Δ PTS1	<i>a2 b13 Potef:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[Potef:egfp-mac1ΔPTS1]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	diese Arbeit
MB215 mCherry-SKL GFP-Mac1 Δ PTS1	<i>a2 b13 Potef:mcherry-SKL</i> <i>ip^R[Potef:egfp-mac1ΔPTS1]ip^S</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	diese Arbeit
Bub8 GFP+DEG1	<i>a2 b4</i> <i>ip^R[Potef:egfp-stop-rac1intron]ip^S</i>	Cbx ^R	diese Arbeit
Bub8 GFP+DEG2	<i>a2 b4</i> <i>ip^R[Potef:egfp-stop-cdc24]ip^S</i>	Cbx ^R	diese Arbeit
Bub8 GFP-NosT+DEG2	<i>a2 b4</i> <i>ipR[Potef:egfp-NosT-stop-cdc24]ipS</i>	Cbx ^R	diese Arbeit
Bub8 GFP	<i>a2 b4 ipR[Potef:egfp]ipS</i>	Cbx ^R	diese Arbeit
Bub8 PGK1*GFP	<i>a2 b4 ipR[Potef:pgk1*egfp]ipS</i>	Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 PGK2*GFP	<i>a2 b4 ipR[Potef:pgk2*egfp]ipS</i>	Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 GFP-PGK ^{TRP}	<i>a2 b4 ipR[P_{pgk1}:egfp-pgk1^{TRP}]ipS</i>	Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 gapd Δ PTS1 pgk1 Δ PTS1	<i>a2 b4 pgk1ΔPTS1</i>	Hyg ^R , Nat ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012
Bub8 mCherry-SKL GFP-PTS1 _{PGK2} (B. t.)	<i>a2 b4 Potef:mcherry-SKL</i> <i>ipR[Potef:egfp-PTS1_{pgk2} (B. t.)]ipS</i>	Hyg ^R , Cbx ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012*

4.3.4 Plasmide

In der nachfolgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide dargestellt mit zugehörigen Referenzen dargestellt.

Tab. 2 Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Resistenz	Referenz
pbs-hhn	Amp ^R , Hyg ^R	Kämper <i>et al</i> , 2004
pMF-1n	Amp ^R , Nat ^R	Brachmann <i>et al</i> , 2004
pMF-1p	Amp ^R , Nat ^R	Brachmann <i>et al</i> , 2004
pJet2.1 + Stuffer	Amp ^R	Kay Schink, pers. Mitteilung
p123	Amp ^R , Cbx ^R	Aichinger <i>et al</i> , 2003
potefALA ₆ MMXN (pOTEF)	Amp ^R , Cbx ^R	Böhmer <i>et al</i> , 2008
pMac1Mac2	Amp ^R , Cbx ^R	Björn Sandrock, pers. Mitteilung
pMacΔPTS1Mac2ΔPTS1	Amp ^R , Cbx ^R	Björn Sandrock, pers. Mitteilung
pMF-1c	Amp ^R , Cbx ^R	Brachmann <i>et al</i> , 2004
pJet <i>gpd1</i> ΔPTS1	Amp ^R , Hyg ^R	Freitag <i>et al</i> , 2012

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide mit verwendeten Oligonukleotiden und Klonierungsstrategien beschrieben. Oligonukleotide sind immer in 5'-3' Richtung angegeben. Restriktionsschnittstellen sind in Rot hervorgehoben. Die Teile der Oligonukleotide, die direkt der Amplifikation auf der ersten Matrize dienen, sind in Großbuchstaben und Überhänge in Kleinbuchstaben gezeigt. Plasmide wurden vor der Verwendung sequenziert.

pGFP+Deg1

Dieses Plasmid enthält das Intron von *rac1* hinter dem Stopcodon von GFP. Die das *rac1*-Intron beinhaltende Sequenz wurde in die NotI-Schnittstelle von p123 eingefügt. Dabei wurde ein Linker mit zusätzlichen Schnittstellen generiert.

Oligonukleotide

Fw („Forward“): catg**cgggccgctccggatggccaagggccc**
GACCATCAAGTGTGTAGTCG

pGFP+Deg2

Dieses Plasmid enthält den ORF von *cdc24* hinter dem Stopcodon von GFP. Der ORF von *cdc24* wurde in die NotI-Schnittstelle von p123 eingefügt. Dabei wurde zusätzlich ein Linker (siehe pGFP+Deg1) generiert.

Oligonukleotide

Fw: catg**cgggccgctccggatggccaagggccc**ATGGCTGCTT
CCACATCGC

Rev(„Reverse“): catcgggccgaggACGCTCAACAGTT
TGAGG

Rev: catcgggccgaggGTTGACGACCAACTCGACT
TCG

pGFP+Deg2 NosT

Dieses Derivat von pGFP+Deg2 enthält das MscI/EcoRV-Fragment aus pOTEF, mit dem *Nos* Terminator in der MscI-Schnittstelle direkt hinter dem offenen Leserahmen von *egfp*.

pOTEFmcherrySKL

In diesem Plasmid wurde in pOTEF der offene Leserahmen von *egfp* durch *mCherrySKL* ersetzt. Dabei wurde zusätzlich eine EcoRV-Schnittstelle eingeführt.

Fw: atctccgggATGGTGAGCAAGGGCGAGG

Rev: acagcgccgcgaattcttagagcttgaCTTGACAGCT
CGTCCATGC

pGFP-GAPDH

Dieses Plasmid enthält *gapd* mit Intron und PTS1-Motiv codierendem Bereich inseriert zwischen die MluI- und XbaI-Schnittstellen von pOTEF, um eine N-terminale GFP-Fusion zu erzeugen.

Fw: gacaacgctgATGTCTCAGGTCAACATCGG

Rev: atactctagaCTTAAAGTCGTGAAGCGCCA

pGFP-GAPDH_{cyt}

Dieses Plasmid enthält den *gapd* ORF inseriert zwischen die MluI- und XbaI-Schnittstelle von pOTEF, um eine N-terminale GFP-Fusion zu erzeugen. Der ORF endet nach dem ersten Stop. Somit kann keine verlängerte Isoform entstehen.

Fw: gacaacgctgATGTCTCAGGTCAACATCGG

Rev: atactctagattacGCGCTGTCCTTCTGAGC

pGFP-GAPDH_{cyt}

Dieses Plasmid enthält den *gapd* ORF inseriert zwischen die MluI- und XbaI-Schnittstelle von pOTEF, um eine N-terminale GFP-Fusion zu erzeugen. Der ORF endet hier konstitutiv auf das

pmCherrySKL

Dieses Plasmid ist ein Derivat von pbs-hhn. Es enthält das PvuII/EcoRV-Fragment aus pOTEFmcherry-SKL mit dem *otef*-Promotor, dem ORF von *mCherrySKL* und dem *Nos*-Terminator. Dieses Fragment wurde in die ApaI-Schnittstelle von pbs-hhn inseriert, deren Überhänge mit der Klenow-Polymerase aufgefüllt waren.

pGFP-PGK

Dieses Plasmid enthält den ORF von *pgkl* und zusätzlich noch die Sequenz die bei Überlesen des Stopcodons zu der verlängerten Isoform führt. Diese Sequenz wurde in die MluI- und XbaI-Schnittstellen von pOTEF inseriert.

Fw: atatacgctgATGTCTCTTTCCAGCAAGCTTGG

Rev: atattctagaTGCTCACAGTTTGGGGACGGC

pGFP-PGK_{cyt}

Dieses Plasmid enthält den ORF von *pgkl* ohne die Sequenz nach dem ersten Stopcodon. Diese Sequenz wurde in die MluI- und XbaI-Schnittstellen von pOTEF inseriert.

Fw: atatacgctgATGTCTCTTTCCAGCAAGCTTGG

Rev: atattctagatTCACTTCTCCGAAAGCTCC

TTG

pGFP-PGK_{pex}

Dieses Plasmid enthält den ORF von *pgkl* mit der Sequenz nach dem ersten Stopcodon. Das Stopcodon wurde durch ein Serincodon ersetzt, so dass konstitutiv die verlängerte Isoform der PGK entsteht. Diese Sequenz wurde in die MluI- und XbaI-Schnittstellen von pOTEF inseriert.

Fw: atatacgctgATGTCTCTTTCCAGCAAGCTTGG

Rev: atattctagatTCACAGTTTGGGGACGGCAG

PTS1.

Fw: gacaacgcgtgATGTCTCAGGTCAACATCGG

Rev: atactctagattacTTAAAGTCGTGAAGCGC

CAGCGCTGTCTTCTGAGCCATG

pPGK*GFP2

In dieses Plasmid wurde der ORF von *pgk1* und 84 Nukleotide nach dem ersten Stopcodon zwischen die BamH1- und SmaI-Schnittstelle von pOTEF inseriert.

Das zweite Stopcodon wurde durch TGG ersetzt.

Fw: atatggatccATGTCTCTTTCCAGCAAGCTTGG

Rev: atatcccggaATGGCATGTTTTGGCCAAC

TGCATTCGTGGTTGTGGAGAAAAAATGCGA

CATGCCACAGTTTGGGGACGGCAGCATCGAG

pP_{pgk1}GFP-PGK^{TRP}

In dieses Plasmid wurde der *pgk1*-Promotor in pOTEF (BglII/SmaI) inseriert und außerdem der ORF von *pgk1* und 84 Nukleotide nach dem ersten Stopcodon an *egfp* fusioniert. Das zweite Stopcodon wurde durch TGG ersetzt.

Fw (Promotor) : atatagatctCTCCTCATCATATAG
ACTGATGTTCG

Rev (Promotor): atatcccggaTTTCGTAGACGTGTA
CCAGTTAC

Fw (pgk1-ORF): atatacgctgATGTCTCTTTCCAG
CAAGCTTGG

Rev (pgk1 ORF): atattctagaTTAATGGCATGTTTT
GGCCAACTGCATTCGTGGTTGTGGAGAAAA
AATGCGACATGCCACAGTTTGGGGACGGCA
GCATCGAG

pGFP-Pte1

Dieses Derivat von pOTEF enthält den ORF von *pte1* inseriert zwischen die MluI- und XbaI-Schnittstellen, um eine N-terminale GFP-Fusion zu erzeugen.

Fw: atatacgcgtgATGACCAAAGCAGGGGCAAG

Rev: atattctagatTCACAGCTTTGGCTTTGGCGAC

CATCGAGTCCCTTCTCCG

pPGK*GFP1

In dieses Plasmid wurde der ORF von *pgk1* und 3 Nukleotide nach dem ersten Stopcodon zwischen die BamH1- und SmaI-Schnittstelle von pOTEF inseriert.

Fw: atatggatccATGTCTCTTTCCAGCAAGCTTGG

Rev: atatcccggaTCACTTCTCCGAAAGCTCC

pGFP-Gpd1

Dieses Derivat von pOTEF enthält den ORF von *gpd1* inseriert in die MluI-Schnittstelle, um eine N-terminale GFP-Fusion zu erzeugen.

Fw: atatacgcttATGTCAACCGCCTCGACATCA
AGC

Rev: atatacgctCTACAGACGACTCGTCAAATCG

pGFP-Tpi_{pex}

Dieses Derivat von pOTEF enthält den ORF von *tpi1* inseriert in die MluI- und XbaI-Schnittstellen, um eine N-terminale GFP-Fusion zu erzeugen. Das erste Stopcodon wurde durch ein Serincodon ersetzt

Fw: atatacgctaATGGCTCGCACTTTCTTCGTTCG

Rev: atattctagaTCAGATCCTAGCCGACTGGC
CAGCTAGTgAAGCGTTAGCGTTGACGATAT
CGAC

pGFP-Mac1

Dieses Plasmid enthält den offenen Leserahmen von Mac1 inseriert in die Msc1- und XbaI-Schnittstellen, um eine N-terminale GFP-Fusion zu erzeugen.

Fw: atatagatcttATGATCAACAACGCTCTCCG

Rev: atattctagaCTAGATGGCCACGCGTGCGG

pGFP-Mac1ΔPTS1

Dieses Plasmid enthält den offenen Leserahmen von Mac1 inseriert in die Msc1- und XbaI-Schnittstellen, um eine N-terminale GFP-Fusion zu erzeugen. Die Sequenz für die letzten drei Aminosäuren fehlt.

Fw: atatagatcttATGATCAACAACGCTCTCCG

Rev: atattctagattaCTAGATGGCCACGCGTGCGG

pGFP-Mac2

Dieses Plasmid enthält den offenen Leserahmen von Mac1 inseriert in die MluI- und XbaI-Schnittstellen, um eine N-terminale GFP-Fusion zu erzeugen.

Fw: atat**acgcgt**gATGCAGGCAGATAAACATGC

Rev: atatt**ctagaa**CTAGAGCTTGGCCTCGGGAGC

pGFP-Mac2ΔPTS1

Dieses Plasmid enthält den offenen Leserahmen von Mac1 inseriert in die MluI- und XbaI-Schnittstellen, um eine N-terminale GFP-Fusion zu erzeugen.

Fw: atat**acgcgt**gATGCAGGCAGATAAACATGC

Rev: atatt**ctagatta**CTCGGGAGCGTCAACGGGGAC

pGFP-FBA

Dieses Plasmid enthält den offenen Leserahmen von *fbal* inseriert in die MscI- und XbaI-Schnittstellen, um eine N-terminale GFP-Fusion zu erzeugen.

Fw: ataat**ggccaaa**ATGGGTGTTCTTGACATTGTTC

Rev: atatt**ctaga**TTAGAGCTTGCCAGTGGAGCC

Im nachfolgenden Teil sind die Oligonukleotide für die Konstrukte zur Herstellung von Deletionsmutanten dargestellt. Als Quelle für Resistenzkassetten dienten pbs-hhn, pMF-1n, pMF-1p und pMF-1c. Diese Konstrukte wurden entweder nach der Ligation und anschließender PCR direkt transformiert oder für die weitere Verwendung in den pJet 2.1 bzw. p123 inseriert. Diese Plasmide wurden dann sequenziert und dienten z. B. dem Austausch von Resistenzkassetten.

***gapd*ΔPTS1**

Linke Flanke

Fw: atac**aatATT**CAAGACGGCAGAAGTTCC

Rev:gtac**ggccatctaggcc**TACGTAACAAATCGATAAA
CACAAAATCGC

Rechte Flanke

Fw: atac**ggcctgagtggcc**ATTGAACATAGTTCCT
CTTTACTCG

Rev: gacg**aatATT**CATGAGTGGCTGAGATCTTG

***pgk1*ΔPTS1**

Linke Flanke

Fw: atgc**aatATT**GTCGCTGCCCTTCCCAC

Rev: atat**ggccatctaggcc**taTCACTTCTCCGAAA
GCTCCTTG

Rechte Flanke

Fw: atat**ggcctgagtggcc**GCATGTCGCATTTTTTCT
CC

Rev: gcgc**aatATT**AGTAGCAGGGGTTAGTTTGAA
ATC

Apex6

Linke Flanke

Fw: gtac**aatatt**TCCTTTAATCGGCCGTATCGG

Rev: atac**ggccatctaggcc**TCGTCAGTCGGAAGAGCG
TACG

Rechte Flanke

Fw: atat**ggcctgagtggcc**TCGATCACTGCACCGCTTA
GC

Apex5a

Linke Flanke

Fw: gtac**aatatt**GTGGGCTTTCGGTGCTCACC

Rev: atac**ggccatctaggcc**CTTGACGGTGACGCTTGT
GTG

Rechte Flanke

Fw: atat**ggcctgagtggcc**CTTCCGTGCTCTGGCAT

Rev: gaca**aatatt**CCGACCAAACCCGTACCATCG

CAC

Rev: gaca**aatatt**CGCAAGCGGAATGTTCTTGATAC

***mdh1*ΔPTS1**

Linke Flanke

Δpex5b

Linke Flanke

Fw: atata**aatatt**GTCTCGAGTTTCTCCGTACACC

Fw: atata**aatatt**CGACGACCTAGTGTCCAGAGG

Rev: atata**ggccatctaggcctta**AGTGAACCTGAACACCCTTGCTG

Rev: atata**ggcctgagtggcc**GGACATGGTGGGCCA

Rechte Flanke

CCACGC

Fw: atata**ggcctgagtgg**CCTCGCCTCCTACATTCATT
CACG

Rechte Flanke

Fw: atata**ggccatctaggcc**CCGGTGTAACACTGCGTGT

Rev: atataatattTCGCTCCGGATCAACTCGGCCG

TGC

Rev: atata**aatatt**ACGACGAGCGTCCAAATCTCGC

Plasmide zur Untersuchung von peroxisomaler Lokalisierung in *S. cerevisiae* basierten alle auf einer modifizierten Version von pCT320 (Freitag *et al.*, 2012; Renicke *et al.*, 2013). In dieses modifizierte Plasmid wurden immer hybridisierte Oligonukleotide inseriert, die für die letzten zwölf Aminosäuren eines potentiell peroxisomalen Proteins codierten. Die modifizierte Version enthält einen „Linker“ mit den Schnittstellen HindIII, MscI und XhoI. Diese Plasmide wurden vornehmlich von Julia Ast in ihrer von mir betreuten Masterarbeit hergestellt.

Beispiel: GAPDH aus *A. nidulans*

Fw: agcttGAAACAGGTCGGAAGCCAATGGCCAGGAGCTCCTTGTAActgca

Rev: gTTACAAGGAGCTCCTGGCCATTGGCTTCCGACCTGTTTCa

4.3.5 Oligonukleotide

In der nachfolgenden Tabelle sind Oligonukleotide gezeigt, die für RT-PCR und qRT-PCR verwendet wurden.

Tab. 3 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
<i>ppi</i> fw	TCGACATCGTCAAGGCTATC	qRT-PCR
<i>ppi</i> rev	CGATGGTGATCTTGGACTTG	qRT-PCR
<i>egfp</i> fw	CATGGTCCTGCTGGAGTTC	qRT-PCR
<i>egfp</i> rev	CTTGTACAGCTCGTCCATGC	qRT-PCR

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
<i>gapd fw</i>	TGCCGGTATCTCTCTCAACA	qRT-PCR
<i>gapd pA</i>	GCGGGCCGATACTTTACTTA	qRT-PCR
<i>gapd rev1</i>	AAAGTCGTGAAGCGCCAGC	qRT-PCR
<i>gapd rev2</i>	TGAAGCGCCATTACGCGCTGT	qRT-PCR
<i>pgkA fw (A. n.)</i>	GCTGAGGACAAGATTAGCCA	RT-PCR
<i>pgkA rev1 (A. n.)</i>	GCTCGTTTCACAAAATTCTTC	RT-PCR
<i>pgkA rev2 (A. n.)</i>	AACGTAGCCATTGTACAGTC	RT-PCR
<i>gapd fw</i>	TGCCGGTATCTCTCTCAACA	qRT-PCR

4.4 Mikrobiologische Methoden

4.4.1 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation des *E. coli*-Stamms Top Ten wurde ein modifiziertes Protokoll nach Hanahan *et al.*, 1991 verwendet. 100 ml einer bei Raumtemperatur in SOB-Medium gewachsenen Kultur mit einer OD₅₅₀ von ungefähr 0,4 wurden pelletiert (4000 Upm, 10 min, 4°C). Die Zellen wurden anschließend in einem Drittel des Ausgangsvolumens in eiskaltem CCMB80-Puffer aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension wieder pelletiert (4000 Upm, 10 min, 4°C) und in einem Zwölftel des Ausgangsvolumens resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 75 µl Portionen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

CCMB80-Puffer

10 mM KOAc pH 7.0
 80 mM CaCl₂*2H₂O
 20 mM MnCl₂*4H₂O
 10 mM MgCl₂*6H₂O
 10% (v/v) Glycerin
 in H₂O_{bid}; pH 6,4

Zur Transformation wurden die Zellen für etwa 5 min auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1-10 µl gelöster Plasmid-DNA bzw. mit einem Ligationsansatz gemischt. Nach 15minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen 90 sec bei 42°C aufgewärmt. Anschließend wurde die Suspension direkt auf dYT-Festmedium mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.4.2 Transformation von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae wurde in YEPD bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 kultiviert. Es wurden die Zellen einer 50 ml Kultur geerntet (2.000 Upm, 3 min) und in sterilem H₂O_{bid} gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml SORB äquilibriert, erneut abzentrifugiert und in 500 µl SORB aufgenommen. Dann wurden 60 µl einer denaturierten DNA-Lösung (10 mg/ml salmon sperm DNA) zugegeben. Die so behandelten Zellen wurden direkt transformiert oder bei 80°C mehrere Monate aufbewahrt.

SORB

100 mM Lithium-Acetat
1 mM Na₂-EDTA
1 M Sorbitol
in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; sterilfiltriert

PEG

100 mM Lithium-Acetat
1 mM Na₂-EDTA
40% PEG3350
in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; sterilfiltriert

Für die Transformation wurden 50 µl kompetente Zellen mit bis zu 10 µl Plasmid-Lösung (etwa 1 µg DNA) und 360 µl PEG für 30 min bei 28°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 15 min bei 42°C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (2.000 Upm, 3 min) und zweimal in 1 ml YEPD gewaschen. Nach zweistündiger Inkubation in YEPD bei 30°C wurde der Transformationsansatz auf entsprechendes SD-Selektionsmedium ausgestrichen.

4.4.3 Transformation von *U. maydis*

Die Transformation von *U. maydis* erfolgte gemäß eines modifizierten Protokolls nach Schulz *et al*, 1990. 50 ml einer *U. maydis* Kultur mit einer optischen Dichte zwischen 0,5 und 1 wurde für 5 min bei 3500 Upm pelletiert und einmal in 20 ml SCS-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5ml SCS mit 2mg/ml Novozym 234 oder 20 mg/ml *T. harzianum* Lysing Enzymes aufgenommen und protoplastiert. Nachdem etwa 80% der Zellen anprotoplastiert waren, wurden 25 ml eiskalte SCS-Lösung zugegeben und die entstehende Zellsuspension für 10 min bei 2300 Upm pelletiert (4°C). Die Zellen wurden weitere zweimal mit eiskalter SCS-Lösung gewaschen, um Reste der Enzyme zu entfernen. Danach wurden die Zellen einmal mit eiskalter STC-Lösung gewaschen und anschließend in 0,5 ml STC-Lösung aufgenommen und in Portionen von 50 µl aufgeteilt. Diese Protoplasten

wurden entweder direkt transformiert oder bei -80°C für eine spätere Verwendung aufbewahrt.

SCS-Lösung

1 M Sorbitol
in 20 mM Na-Citrat
pH 5,8; sterilfiltriert

STC-Lösung

100 mM CaCl_2
1 M Sorbitol in 10 mM Tris-HCl
pH 7,5; sterilfiltriert

STC/PEG-Lösung

40% PEG4000 in STC;
sterilfiltriert

Regenerations-Ager

Top: 1 M Sorbitol in YEPS
1,5% (w/v) Bactoagar
Bottom: wie Top, zusätzlich doppelt konzentriertes Antibiotikum

Zur Transformation von *U. maydis* wurden 50 μl der auf Eis getauten Protoplastensuspension mit 100 ng bis zu 5 μg linearisierter DNA mit einem Volumen von maximal 10 μl vorsichtig vermischt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml STC/PEG-Lösung zugegeben und die entstehende Suspension für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension auf Regenerations-Agar aufgebracht, der kurz zuvor mit 10 ml Top-Agar ohne Antibiotikum überschichtet wurde. Der Bottom-Agar enthält daher doppelt soviel Antibiotikum wie normales Selektionsmedium. Die Regenerations-Agar Platten wurden für drei bis sieben Tage bei 28°C oder bei Raumtemperatur inkubiert. Einzelkolonien wurden dann auf Selektionsmedium vereinzelt und danach mit PCR und/oder Southern-Analyse untersucht.

4.4.4 Wachstumstests auf Fest- und in Flüssigmedium

Für die Untersuchung von Wachstumsphänotypen wurden *U. maydis* Kulturen einer OD_{600} von 1 verwendet, die in YEPS-Medium kultiviert waren. Zu Untersuchung des Wachstums in Flüssig-Medium wurden diese Kulturen mit YNB-Medium mit 2% Glucose bzw. 0,2% Ölsäure/0,1% Tween40 und Ammoniumsulfat gewaschen und mit einer OD_{600} von 0,05 in dem entsprechenden Medium verdünnt und bei 28°C inkubiert. Alle zwei Stunden wurde die OD_{600} der Kulturen bestimmt. Die Kulturen mit Ölsäure/Tween40 wurden vor der

Bestimmung der OD₆₀₀ einmal mit YNB ohne Zusätze gewaschen. Zur Analyse des Wachstums auf Fest-Medium wurden die Kulturen ebenfalls gewaschen und in serieller Verdünnung ausgehend von einer OD₆₀₀ von 1 auf Festmedien mit den jeweiligen Zusätzen und einem Volumen von 6 µl getropft.

4.4.5 Test auf filamentöses Wachstum auf PD-Aktivkohle-Medium

Auf Aktivkohle haltigem Medium bildet *U. maydis* im Zellzyklus arretierte Hyphen aus, die auf der schwarzen Oberfläche gut sichtbar sind (Day & Anagnostakis, 1973). Zur Untersuchung der Hyphenbildung wurden kompatible Stämme einer OD₆₀₀ von 1 gemischt und 6 µl dieser Suspension auf PD-Aktivkohle-Medium getropft. Alternativ wurden Kulturen des haploid pathogenen Stamms SG200 mit einer OD₆₀₀ von 1 verwendet.

4.4.6 Infektion von *Zea mays* mit *U. maydis*

Zur Untersuchung der Pathogenität unterschiedlicher *U. maydis* Mutanten wurden diese in sterilem Wasser auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt. Im Fall des haploid pathogenen Stamms SG200 wurden diese Suspensionen direkt in Maispflanzen infiziert, während im Fall normaler Wildtyp-Derivate kompatible Stämme im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Es wurden immer 500 µl der Suspensionen mit Spritzen in sieben Tage alte Maispflanzen der Sorte Early Golden Bantam (USA) ungefähr 1 cm über der Erde injiziert und möglichst das dritte Blatt des Keimlings infiziert. Die Maispflanzen wurden bei 28°C am Tag und 20°C bei Nacht für 10 Tage in einem Gewächshaus inkubiert bevor die Symptome ausgewertet wurden. Die Beleuchtungsstärke betrug zwischen 28.000 und 90.000 Lux abhängig von der Sonneneinstrahlung zusätzlich zur künstlichen Beleuchtung.

Die Auswertung erfolgte nach modifizierten Kriterien nach Kämper *et al*, 2006. Alle Experimente wurden in mindestens drei biologischen Replikaten durchgeführt und pro Experiment zwischen 20 und 40 Pflanzen infiziert. Die mittleren Symptome aus den drei Replikaten wurden prozentual zur Gesamtzahl der Pflanzen dargestellt.

4.5 Genetische Methoden

4.5.1 Deletion von Genen oder Genfragmenten mittels homologer Rekombination

Zur Deletion von Genen oder von Genfragmenten wurde eine Strategie nach Kämper, 2004 verwendet. 1000 bp flankierende, homologe Regionen dienen in *U. maydis* der zielgerichteten Integration von DNA (z.B. Resistenzkassetten) an einen bestimmten Ort ins Genom durch homologe Rekombination, vorausgesetzt man kann auf dieses relativ seltene Ereignis selektionieren. Um Gene oder Genfragmente zu entfernen wurden Konstrukte hergestellt, die eine Resistenzkassette enthielten und links und rechts von genau der Sequenz eingerahmt waren, die den zu deletierenden Bereich im Genom von *U. maydis* flankiert. Wurden nur Teile eines ORFs deletiert, wurde ein neues Stopcodon eingefügt. Resistenzkassette und flankierende Sequenzen wurden mittels SfiI geschnitten (Bestanteil der Oligonukleotide) und direktional ligiert. Diese Ligationsprodukte wurden mit PCR amplifiziert und entweder direkt transformiert oder aber in den Klonierungsvektor pJet1.2 (Fermentas) inseriert und vor der Transformation sequenziert. Alle verwendeten Kassetten finden sich in Brachmann *et al*, 2004 und enthalten flankierende SfiI-Schnittstellen.

4.5.2 Integration von Konstrukten in den *ip*-Locus von *U. maydis*

Die Aminosäuresubstitution Histidin zu Leucin an der Position 257 der Succinatdehydrogenase (Sdh1; Um1172) führt in *U. maydis* zur Ausprägung einer Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Carboxin (Broomfield & Hargreaves, 1992). Diese Mutation kann genutzt werden, um gezielt Konstrukte in den *sdh1*-Locus zu integrieren (*ip*-Locus). Linearisiert man ein Plasmid, das *sdh1* in mutierter Version beinhaltet und transformiert dieses Plasmid in Anwesenheit von Carboxin in *U. maydis* so erhält man Stämme mit einem integrierten Plasmid, das von einer mutierten Version von *sdh1* (*ip^r*) und einer nativen Version von *sdh1* (*ip^s*) flankiert wird. Diese Strategie erlaubt folglich die ortsspezifische Integration beliebiger DNA; allerdings integrieren die Konstrukte häufig mehrfach hintereinander. Mittels Southern Analyse kann anschließend die Integrationshäufigkeit ermittelt werden.

4.6 Molekularbiologische Methoden

4.6.1 Restriktion und Dephosphorylierung von DNA

DNA wurde mit Restriktionsenzymen (Fermentas oder NEB) je nach Applikation zwischen 10 min und 14 Stunden nach Herstellerangaben geschnitten. Dabei wurden zwischen 0,2 und 5 µg DNA eingesetzt. Für Klonierungen wurden häufig Vektorfragmente noch für etwa eine Stunde bei 37°C dephosphoryliert und die Phosphatase bei 70°C für 15 min inaktiviert.

4.6.2 Ligation von DNA

Ligationsreaktionen wurden entweder über Nacht bei 16°C oder für ungefähr 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (T4-DNA Ligase; Roche). Bei der Insertion von DNA-Fragmenten in geöffnete Vektoren wurde ein mindestens zweifacher molarer Überschuss der jeweiligen Fragmente eingesetzt. Falls die Vektoren mit stumpfen Enden vorlagen, wurde ein mindestens fünffacher Überschuss der zu inserierenden DNA-Fragmente verwendet. Für die Ligation von drei Fragmenten wurden alle drei Fragmente in äquimolarer Konzentration verwendet. Ligationsansätze hatten ein Volumen zwischen 10 µl und 50 µl und es wurden zwischen 50 ng und 5 µg DNA eingesetzt.

4.6.3 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al*, 1977). Zwischen 500 ng und 2 µg DNA (je nach Größe) und 0,5 µM eines entsprechenden Oligonukleotids wurden entweder mit dem BigDye Terminator Kit (Invitrogen) nach Herstellerangaben vermischt und inkubiert oder in Wasser gelöst (ad 15 µl). Die Reaktionsansätze wurden entweder am MPI-Marburg oder von der Firma Eurofins MWG Operon weiter bearbeitet.

4.6.4 Agarosegel-Elektrophorese

DNA wurde zwischen 80 V und 150 V in 1x TAE-Gelen (0,8-1,5% Agarose) aufgetrennt. RNA wurde in 1x MOPS-Gelen (1% Agarose) aufgetrennt. Den Gelen wurde nach dem Aufkochen Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugesetzt. Bei RNA-Gelen wurden Kämme, Schlitten und Kammern zuvor mindestens für eine Stunde in RNase freiem Wasser (0,1% Diethylpyrocarbonat, autoklaviert) inkubiert. DNA bzw. RNA wurden vor der Beladung mit 10x bzw. 6x Auftragspuffer vermischt. RNA-Lösung wurde außerdem vor der Beladung mit einem Gemisch aus Glyoxal, DMSO und 10x MOPS-Puffer im Verhältnis 1:1 gemischt und bei 60°C für eine Stunde denaturiert. Als Größenstandards dienten der GeneRuler™ DNA-Ladder Mix (Fermentas) bei der Auftrennung von DNA bzw. die RiboRuler™ High Range RNA Ladder (Fermentas) bei der Auftrennung von RNA.

50x TAE-Puffer

2M Tris-Base
2M Acetat
50mM Na₂-EDTA
in H₂O_{bid}

10x MOPS-Puffer

200 mM MOPS (pH 7)
80 mM Natriumacetat
10 mM Na₂-EDTA

10x DNA-Auftragspuffer

0,2% (w/v) Orange G
50% (w/v) Saccharose
1 mM Na₂-EDTA
in H₂O_{bid}

6x RNA-Auftragspuffer

50% Saccharose
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylencyanol FF
in MOPS-Puffer

Glyoxal-Mix

2M Glyoxal
60% DMSO (v/v)
2x MOPS-Puffer

4.6.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionen (Mullis *et al*, 1986; Saiki *et al*, 1985, 1988) wurden mit Hilfe eines TPersonel Thermocyclers (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten kleiner als 1000 bp oder zur Überprüfung von Mutanten wurde die *Pfu*-Polymerase (eigene Herstellung; ~500bp/min) verwendet. Für größere Fragmente wurde entweder die Phusion Polymerase (~2000 bp/min, NEB) oder die KOD Extreme Polymerase (1000 bp/min; Merck) verwendet. PCR-Reaktionen gliederten sich in eine initiale Denaturierung gefolgt von 34 Zyklen bestehend aus Denaturierung, Annealing (Anlagerung der einzelsträngigen Oligonukleotide) und Elongation. Teilweise wurde am Ende noch eine finale Elongation von 5 min durchgeführt. Unten sind PCR-Programme für die jeweiligen Polymerasen dargestellt. Die Elongationszeiten wurden in Abhängigkeit der Geschwindigkeit der verwendeten Polymerasen und der Größe der zu amplifizierenden DNA gewählt. Annealing-Temperaturen waren abhängig von der Nukleotid-Zusammensetzung der Oligonukleotidprimer.

***Pfu*- bzw. Phusion-Polymerase**

zwischen 1 ng und 300 ng Matritzen-DNA

250 µM dNTPS (1:1:1:1 Verhältnis)

1 µM Oligonukleotid 1

1 µM Oligonukleotid 2

1 x konzentrierter *Pfu*-Puffer bzw. HF-Puffer (Finnzymes) bzw. GC-Puffer (Finnzymes)

1 U *Pfu*-Polymerase bzw. 0,5 U Phusion-Polymerase

0-5 µl DMSO

Programm: 98°C/1 min – (98°C/30 s - 50-65°C/15 s - 72°C/ x min) x 34 - 72°C/5 min

(Ansatz zwischen 20 und 50 µl)

KOD Extreme Polymerase

zwischen 1 ng und 300 ng Matritzen-DNA

250 µM dNTPS (1:1:1:1 Verhältnis)

1 µM Oligonukleotid 1

1 µM Oligonukleotid 2

1 x konzentrierter KOD-Puffer (Novagen)

1 U KOD-Extreme Polymerase

Programm: 94°C/2 min – (94°C/30 s - 50-65°C/15 s - 68°C/x min) x 34- 68°C/10 min

4.6.6 Quantitative PCR (qRT-PCR) und Untersuchung von cDNA

Für Expressionsanalysen wurde ~1µg Gesamt-RNA aus *U. maydis* mit Hilfe des RNeasy Kits (Quiagen; Hilden) aufgereinigt und danach mit dem First Strand cDNA Kit (Fermentas) zunächst nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. 1 µl einer 1/10 verdünnten cDNA-

Lösungen wurden zur Bestimmung der relativen Transkriptmenge mit Hilfe des Maxima SYBR Green qPCR-Mastermixes (Fermentas) pro qRT-PCR Reaktion untersucht. Die Analysen erfolgten auf einem Bio-Rad-iCycler (Bio-Rad, München) mit dem Programm: 95°C/2 min – (95°C/30 s - 60°C/30 s - 72°C/30 s) x 45. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Bio-Rad-Software Version 3.0a und des Bio-Rad Gene Expression Makros. Die Spezifität der Amplifikation wurde durch eine Analyse der Schmelzkurven überprüft. Als Referenzgen für die Amplifikation diente *ppi* (*um3726.2*). Die Effizienz der verwendeten Oligonukleotide wurde mit einer Eichkurve bestimmt, die durch die serielle Verdünnung einer cDNA-Probe generiert wurde.

cDNA aus *A. nidulans* wurde mit Oligonukleotiden spezifisch für *pgkA* amplifiziert (siehe 4.5.4) und die erhaltenen Produkte in den Klonierungsvektor pJet1.2 (Fermentas) inseriert und sequenziert.

4.6.7 Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Für die Präparation von Plasmid DNA, die für Sequenzierungen verwendet werden sollte bzw. in großem Maßstab benötigt wurde, wurde das ZR-Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) bzw. das GenElute HP Maxiprep Kits (Sigma-Aldrich) verwendet. Ansonsten wurde Plasmid-DNA mit Hilfe der kochenden Lyse (Sambrook et al., 1989) extrahiert. Dazu wurden 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur pelletiert (13.000 Upm). Dem Zellpellet wurden 350 µl STET und 25 µl Lysozym-Lösung zugesetzt, die Proben auf einem Vibrax-VXRSchüttler (IKA, Staufen) für 1 min geschüttelt und anschließend 1 min bei 95°C inkubiert. Die lysierten Zellbestandteile und die denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert und aus der wässrigen Lösung entfernt. Zum Teil wurden 5 µl des Überstand direkt für Restriktionsanalysen verwendet oder die enthaltene Plasmid-DNA durch Zugabe von 35 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,3) und 450 µl Isopropanol für 5 min bei Raumtemperatur gefällt und pelletiert (13.000 Upm, 5 min). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, 5 min an der Luft getrocknet und in 50 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Gelöste DNA wurde bei -20°C gelagert.

STET-Puffer

50 mM Na₂-EDTA
8% (w/v) Saccharose
5% (v/v) Triton X-100
in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

Lysozym-Lösung

10 mg/ml Lysozym
in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

TE-Puffer

1 mM Na₂-EDTA
in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

4.6.8 Isolierung von genomischer DNA aus *U. maydis*

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Hoffman & Winston, 1987. 1,5 ml einer Übernachtskultur in YEPS wurden zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Reaktionsgefäß pelletiert (13000 Upm, 1 min) und das Pellet in 500 µl Ustilago-Lysepuffer und 500 µl Phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA, Staufen) aufgeschlossen und anschließend 15 min zentrifugiert (13.000 Upm). 400 µl des Überstands in ein neues wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Ethanol und 40 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,3) gefällt. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 20 min) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, für 5 min an der Luft getrocknet und in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Gelöste DNA wurde bei -20°C gelagert.

Ustilago-Lysepuffer

10 mM Tris/HCl pH8,0
100 mM NaCl
1 mM EDTA
1 % (w/v) SDS
2 % (w/v) Triton X-100

Phenol/ Chloroform

50 % (v/v) Phenol
50 % (v/v) Chloroform

4.6.9 Isolierung von RNA aus *U. maydis*

Zur Präparation von RNA aus *U. maydis* wurden 10 – 50 ml einer exponentiell wachsenden Kultur isoliert. Hierzu wurde die Kultur zunächst pelletiert (10 min, 3500 upm) und das Sediment bei -80° C schockgefroren. Anschließend wurde das Sediment in 1 ml TRIzol Reagenz (Invitrogen) aufgenommen und in ein vorbereitetes 2 ml Reaktionsgefäß mit 0,3 g Glasperlen überführt. Die Zellen wurden in einer Zelmühle 10 min bei maximaler Geschwindigkeit aufgeschlossen. Dann wurden die Proben kurz anzentrifugiert und mit 200

µl Chloroform vermischt. Diese Suspensionen wurden 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 13000 Upm und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die enthaltene RNA sedimentiert (13000 Upm, 15 min, 4°C). Das Sediment wurde mit 1 ml 80% Ethanol gewaschen und das Pellet für 5 min bei Raumtemperatur getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 50 µl RNase freiem Wasser gelöst. Gelöste RNA wurde bei -80°C gelagert.

4.6.10 Transfer und Nachweis von DNA auf Membranen (Southern Blot)

Zur Detektion von spezifischen DNA Fragmenten bei der Überprüfung von *U. maydis* Mutanten wurde die enzymatisch geschnittene DNA auf positiv geladene Nylonmembranen übertragen (Southern, 1975). Zunächst wurde genomische *U. maydis* DNA mit einem entsprechenden Restriktionsenzym (um z. B. die DNA von Mutanten und Wildtypstämmen zu unterscheiden) geschnitten und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde zunächst 15 min in 0,25 M HCl inkubiert, um Purine abzuspalten. Anschließend wurde das Gel in 0,4 M NaOH überführt und für 20 min geschwenkt. Der Transfer der DNA aus dem Gel auf die Nylonmembran (Roth) erfolgte über Kapillarkräfte. Aus einem Tank mit 0,4 M NaOH wurde mit Whatman-Papier und Papierhandtüchern ein Sog durch Gel und Membran erzeugt. Der Transfer erfolgte für mindestens vier Stunden, meistens aber über Nacht. Die auf der Nylonmembran fixierte DNA wurde mit einer radioaktiven Sonde hybridisiert (Church & Gilbert, 1984). Geeignete Sonden wurden mit Hilfe des Amersham Megaprime DNA Labeling Systems (GE-Healthcare, Freiburg) nach Herstellerangaben synthetisiert. Dazu wurden 5 µl α -³²P-dCTP (Hartmann Analytic, Braunschweig). Die Membran wurde zunächst 20 min bei 60°C in 15 ml Southern-Hybridisierungspuffer inkubiert. Die Sonde wurde 5 min bei 95°C denaturiert und hinzugegeben (Endkonzentration ca. 10⁶ cpm/ml) und die Membran über Nacht bei 60°C weiter inkubiert. Anschließend wurde die Membran anschließend zweimal mit 15 ml Southern-Waschpuffer für 30 min gewaschen. Zur Detektion der Signale wurde die getrocknete Membran in Plastikfolie eingeschweißt und für vier bis 24 Stunden in einer Phosphorimager Kassette (GE-Healthcare) exponiert. Die Detektion der Signale erfolgte mit Hilfe eines Phosphorimagers (Storm860, GE-Healthcare).

Southern-Hybridisierungspuffer

7 % (w/v) SDS

500 mM Natriumphosphat Puffer pH 7,0

Southern-Waschpuffer

1 % (w/v) SDS

100 mM Natriumphosphat Puffer pH 7,0

4.6.11 Transfer und Nachweis von RNA auf Membranen (Northern Blot)

Der Transfer und die Detektion von RNA auf Membranen erfolgte analog zum Transfer von und der Detektion von DNA (4.6.10). Allerdings wurde denaturierte RNA in MOPS-Gelen aufgetrennt (4.6.4) und das Gel vor der Übertragung für 20 min schwenkend in 20x SSC-Puffer inkubiert. Der Kapillarblot wurde wie in 4.6.10 beschrieben durchgeführt, als Transferlösung wurde 20x SSC-Puffer verwendet. Anschließend wurde die RNA durch UV-Bestrahlung (254 nm, 1200 mJ/cm²) in einem Stratalinker 2400 (Stratagene, USA) kovalent an die Membran gebunden. Die Hybridisierung und Auswertung erfolgte wie beim Southernblot. Es wurden für Hybridisierung und Waschen die unten aufgeführten Lösungen benutzt. Nach der Auswertung wurde die Sonde gegebenenfalls entfernt (Strip-Puffer; 3x 20 min und 80°C) und der Blot mit einer anderen Sonde hybridisiert.

Northern-Hybridisierungspuffer

50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0

50 mM PIPES, pH 6,5

100 mM NaCl

1 mM Na₂-EDTA

5 % (w/v) SDS

Northern Waschpuffer

1x SSC

0,1 % (w/v) SDS

Northern-Strippuffer0,2 % (w/v) SDS in H₂O_{bid}**20x SSC**

300 mM Na-Citrat, pH 7,0

3 M NaCl

4.7 Biochemische Methoden

4.7.1 Isolierung von denaturierten Proteinen aus *U. maydis*

U. maydis Zellen wurden in YEPS bis zu einer OD₆₀₀ von 1 angezogen und 10 ml dieser Kultur pelletiert (3.500 Upm, 5 min). Anschließend wurden die Zellen in 500 µl Thorner-Puffer aufgenommen, resuspendiert und in einem 2 ml Reaktionsgefäß für 5 min bei 95°C erhitzt. Nach Zugabe von 0,3 g Glasperlen wurden die Proben für 5 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach erneutem Erhitzen (5 min, 95°C) wurden die Proben abzentrifugiert (13.000 Upm, 1 min) und 5 – 20 µl des Überstandes für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) eingesetzt. Alternativ wurden die Präparationen bei –80°C eingefroren und vor der Verwendung erneut erhitzt (5 min, 95°C) und abzentrifugiert (13.000 Upm, 1 min).

Thorner-Puffer

8 M Urea,
5% (w/v) SDS
0.1 mM Na₂-EDTA
0.01% (w/v) Bromphenolblau,
50 mM Dithiothreitol (kurz vor Verwendung)
in 100 mM Tris-HCl, pH 6,8

4.7.2 Isolierung nativer Proteine aus *U. maydis*

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus *U. maydis* wurden 10 - 50 ml einer in YEPS gezogenen Flüssigkultur (OD₆₀₀ = 1) abzentrifugiert (3500 Upm, 5 min), das Pellet mit 10 ml TBS-Puffer gewaschen und erneut abzentrifugiert (3500 Upm, 5 min). Anschließend wurde das Pellet in 500 µl TBS aufgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Zellsuspension wurden 0,3 g Glasperlen, 5 µl 10 % Triton X-100 und 5 µl Protease Inhibitor Cocktail für Pilze (Sigma-Aldrich) zugesetzt und die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder mindestens eine Stunde bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden mit einem Vibrax-VXRSchüttler (IKA) für 10 min bei 4°C aufgeschlossen und Zellbestandteile abzentrifugiert (13000 Upm, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei -80°C.

TBS-Puffer

50 mM Tris/HCl pH7,5
150 mM NaCl

4.7.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach einer modifizierten Methode nach Bradford, 1976 ermittelt. Dazu wurde die Bio-Rad Protein Assay Reagenz (Bio-Rad) nach Herstellerangaben verwendet.

4.7.4 Elektrophorese von Proteinen

Für die Auftrennung von Proteinen wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli, 1970 angewendet. Proteine erhalten durch Bindung an SDS eine negative Ladung, was die Auftrennung in einem elektrischen Feld erlaubt. Es wurden Gelkammern (Mini Protean System; Bio-Rad) mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Gele setzten sich aus Sammelgel und Trenngel zusammen. Das Sammelgel dient der Konzentrierung der Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel. Im Trenngel werden die Proteine nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Die Molekülmasse der aufgetragenen Proteine wurde durch ein Proteinstandardgemisch (15 - 170 kD; Prestained Page Ruler; Fermentas) bestimmt. Die Auftrennung erfolgte bei 150 V.

SDS-Laufpuffer

200 mM Glycin
0,2% (w/v) SDS
in 25 mM Tris-HCl, pH 8,8

Sammelgel

5% (v/v) Acrylamid
0,1% (w/v) SDS
in 125 mM Tris-HCl, pH 6,8
0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat
0,05% (v/v) TEMED

Trenngel

8 - 12% (v/v) Acrylamid
0,1% (w/v) SDS
in 375 mM Tris-HCl, pH 8,8
0,1% (w/v) Ammoniumpersulfat
0,05% (v/v) TEMED

4.7.5 Transfer und Nachweis von Proteinen (Western Blot)

Die im Gel aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Wet-Transfer System (Bio-Rad) auf eine PVDF-Membran (Roth) übertragen. Die Membran wurde vor der Verwendung mit kurzes mit Methanol aktiviert. Anschließend wurde das Gel auf die Membran gelegt, mit je einer Lage in Western-Transfer-Puffer getränktem Whatman-Papier oben und unten beschichtet und zwischen ebenfalls in Western-Transfer-Puffer getränkte Schwämme gelegt. Anschließend wurde dieser Stapel in einer Kassette in die mit Western-Transfer-Puffer gefüllte Wet-Blot Apparatur eingelegt und die Proteine über Nacht bei 25 V auf die PVDF-Membran transferiert.

Western-Transfer-Puffer

200 mM Glycin
20% (v/v) Methanol
in 25 mM Tris-HCl, pH 10,4

Die auf die PVDF-Membran überführten Proteine wurden mit Hilfe von Antikörpern detektiert. Zunächst wurde die Membran in TBS-T (5% Milchpulver) 20 min bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung zugegeben (GFP mouse monoclonal IgG2a; Santa Cruz Biotechnology oder Tub1 mouse monoclonal IgG; Calbiochem) und für 2 h bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und danach der sekundäre HRP (horse raddish peroxidase) gekoppelte Antikörper (rabbit anti-mouse IgG-HRP conjugate, Santa Cruz Biotechnology) in einer 1:1000 Verdünnung in TBS-T (5% Milchpulver) zugefügt und für 45 mit der Membran schwenkend inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (siehe oben) wurde der Western Blot ausgelesen.

Zur Entwicklung wurde die Membran mit einer Mischung der Detektionslösungen A und B inkubiert und die Signale mit einem Chemocam Imaging System (Intas; Göttingen) aufgenommen und mit ImageJ ausgewertet (Abràmoff *et al.*, 2004).

TBS-T

0,1 % (v/v) Tween 20 in TBS

Detektionslösung A

100 mM Tris/HCl pH 8,5
2,5 mM Luminol
400 µM p-Cumarsäure

Detektionslösung B

100 mM Tris/HCl pH 8,5
5,4 mM H₂O₂

4.7.6 Isolierung von Glykolipiden aus *U. maydis*

Zur Präparation der Glykolipide Ustilaginsäure und MEL aus *U. maydis* wurden drei Tage alte Kulturen verwendet (siehe 4.2.3). Von diesen Kulturen wurden 0,5 ml abgenommen und mit 0,5 ml Ethylacetat vermischt. Diese Ansätze wurden 10 Minuten auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (13000 Upm, 10 Minuten) wurde der Überstand abgenommen und die Flüssigkeit bei 70°C und 600 Upm eingedampft. Die isolierten Lipide wurden schließlich in 15 µl Methanol aufgenommen.

4.7.7 Auftrennung und Nachweis der Glykolipide mit Dünnschichtchromatographie (DC)

10 µl Glykolipidlösung wurden auf eine DC-Aluminium-Platte mit Kieselgel als Trägermaterial (Merck) getropft und 5 Minuten bei RT getrocknet. Anschließend wurden die enthaltenen Glykolipide mit Hilfe eines Laufmittels aus Chloroform:Methanol:H₂O (65:25:4) aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte für ungefähr 25 Minuten bzw. bis die Laufront das Ende der Platte erreichte. Die Platte wurde für ca. 10 min an der Luft getrocknet. Zur Detektion der Glykolipide wurde die DC-Platte mit einem Gemisch aus Eisessig: Schwefelsäure:Anisaldehyd (50:1:0,5) besprüht. Nach 15 min Trocknen an der Luft wurde die DC-Platte für 2 min bei 150°C erhitzt, bis Glykolipide als Banden sichtbar wurden.

4.7.8 Massenspektrometrische Untersuchungen der Glykolipide

Für massenspektrometrische Messungen wurden die eingedampften Glykolipidproben in 50% Methanol aufgenommen und über HPLC aufgetrennt. Die massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgten über 1100 MSD-A ESI-Quadrupol Massenspektrometer (Agilent, Böblingen), und die hochaufgelösten Massenspektren und MSⁿ Messungen wurden mit dem LTQ-FT (Thermo Scientific; Bremen) durchgeführt. Der Massenbereich für die Quadrupol-Messungen erstreckte sich von 650 bis 850 m/z (im positiven Ionen Modus). Für die hochaufgelösten Messungen erstreckte sich der Massenbereich von 80 bis 800 m/z, und die FT-Auslösung betrug 100000 (Msn: 2,5 m/z, normalisierte Kollisionsenergie: 30 (Breitband-Modus)). Der HPLC- Gradient war für beide Messverfahren identisch. Proben wurden über eine 250/2-Nucleosil-C8-Säule mit einer Partikelgröße von 3 µm (Macherey-Nagel; Düren)

gegeben. Ein Gradient von Solvent A (Wasser, 0,5% Ameisensäure) und Solvent B (Methanol, 0,045% Ameisensäure) stieg linear von 60 % B zu 95 % B in 30 Minuten. Abschließend wurde für 10 Minuten konstant mit 95% B eluiert. Die Flussrate betrug 0,4 ml/min und die Säulentemperatur betrug 45°C. Die UV-Detektion erfolgte bei 215 nm.

4.8 Mikroskopie

Zur Mikroskopie von *U. maydis* oder *S. cerevisiae* Zellen wurde ein Fluoreszenzmikroskop vom Typ Axiovert 200M mit einem Ludel Piezo Drive (Zeiss; Göttingen) verwendet. Als Fluorophore wurden eGFP (Excitation: 488 nm; Emission: 509 nm) und mCherry (Excitation: 587 nm; Emission: 610 nm) verwendet. Die Zellen wurden in einem Volumen von 2 µl auf einen mit einer ca. 0,5 mm dicken Wasseragarschicht bedeckten Objektträger getropft. Anschließend wurde ein Deckglas aufgelegt. Der Wasseragar diente der Fixierung der Zellen an ihrer Position, um unscharfe Bilder zu vermeiden. Zur Anregung der Fluorophore wurden die zur Wellenlänge passenden Filter benutzt. Vergleichsfotos wurden im Differentialkontrast aufgenommen. Der Dokumentation dienten eine Kamera des Typs ORCA (Hamamatsu; Japan) und die Software Volocity 5.0. Die Bilder wurden mit ImageJ bearbeitet (Abràmoff *et al*, 2004).

4.9 Bioinformatik

Für die Suche und den Vergleich von Sequenzen wurden folgende Datenbanken verwendet: National Center for Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov), MIPS *Ustilago maydis* Data Base (MUMDB; mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago), *Saccharomyces* Genome Database (SGD; www.yeastgenome.org), MIPS *Sporisorium reilianum* DataBase (MSRDB; mips.helmholtz-muenchen.de/genre/.../sporisorium/), DOE Joint Genome Institute (JGI; www.jgi.doe.gov/), Silva (www.arb-silva.de/) und ASpGD (www.aspgd.org). Die Analyse von PTS1-Motiven erfolgte mit dem PTS1-Predictor (mendel.imp.ac.at/pts1/; Neuberger *et al*, 2003a, 2003b). Sequenzvergleiche wurden mit ClustalX durchgeführt (Larkin *et al*, 2007). Stammbäume wurden mit iTOL hergestellt (Letunic & Bork, 2007). Die Suche nach polyA-Signalen erfolgte mit einer statistischen Methode nach Van Helden *et al*, 2000.

5 Literatur

- Abràmoff MD, Hospitals I, Magalhães PJ & Abràmoff M (2004) Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* **11**: 36–42
- Aichinger C, Hansson K, Eichhorn H, Lessing F, Mannhaupt G, Mewes W & Kahmann R (2003) Identification of plant-regulated genes in *Ustilago maydis* by enhancer-trapping mutagenesis. *Molecular Genetics and Genomics* **270**: 303–314
- Akashi K, Grandjean O & Small I (1998) Potential dual targeting of an Arabidopsis archaeobacterial-like histidyl-tRNA synthetase to mitochondria and chloroplasts. *FEBS Letters* **431**: 39–44
- Aksam EB, Koek A, Jourdan S, Veenhuis M & Van der Klei IJ (2007) A peroxisomal lon protease and peroxisome degradation by autophagy play key roles in vitality of *Hansenula polymorpha* cells. *Autophagy* **3**: 96–105
- Anderson LE, Bryant JA & Carol AA (2004) Both chloroplastic and cytosolic phosphoglycerate kinase isozymes are present in the pea leaf nucleus. *Protoplasma* **223**: 103–110
- Antonenkova VD (1989) Dehydrogenases of the pentose phosphate pathway in rat liver peroxisomes. *The Federation of European Biochemical Societies Journal* **183**: 75–82
- Antonenkova VD & Hiltunen JK (2006) Peroxisomal membrane permeability and solute transfer. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1697–1706
- Antonenkova VD & Hiltunen JK (2012) Transfer of metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **1822**: 1374–1386
- Antonenkova VD, Sormunen RT & Hiltunen JK (2004) The rat liver peroxisomal membrane forms a permeability barrier for cofactors but not for small metabolites in vitro. *Journal of Cell Science* **117**: 5633–5642
- Ast G (2004) How did alternative splicing evolve? *Nature Reviews Genetics* **5**: 773–782
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K (1987) Current Protocols in Molecular Biology. *Wiley Interscience, New York*
- Banuett F & Herskowitz I (1989) Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**: 5878–5882
- Banuett F & Herskowitz I (1994) Morphological Transitions in the Life Cycle of *Ustilago maydis* and Their Genetic Control by the a and b Loci. *Experimental Mycology* **18**: 247–266

- Banuett F & Herskowitz I (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**: 2965–2976
- Baranov P V, Gesteland RF & Atkins JF (2002) Recoding: translational bifurcations in gene expression. *Gene* **286**: 187–201
- Bartoszewska M, Opalinski L., Veenhuis M & Van der Klei IJ (2011) The significance of peroxisomes in secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi. *Biotechnology Letters* **33**: 1921–1931
- Baumgart E, Fahimi HD, Stich A & Völkl A (1996) L-Lactate Dehydrogenase A-and AB Isoforms Are Bona Fide Peroxisomal Enzymes in Rat Liver. *Journal of Biological Chemistry* **271**: 3846–3855
- Bauwe H, Hagemann M & Fernie AR (2010) Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in Plant Science* **15**: 330–336
- Bernhardt K, Wilkinson S, Weber APM & Linka N (2012) A peroxisomal carrier delivers NAD⁺ and contributes to optimal fatty acid degradation during storage oil mobilization. *The Plant Journal*
- Bertram G, Innes S, Minella O, Richardson JP & Stansfield I (2001) Endless possibilities: translation termination and stop codon recognition. *Microbiology* **147**: 255–269
- Bevan M, Barnes WM & Chilton MD (1983) Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research* **11**: 369–385
- Birschmann I, Stroobants AK, Van den Berg M, Schafer A, Rosenkranz K, Kunau WH & Tabak HF (2003) Pex15p of *Saccharomyces cerevisiae* provides a molecular basis for recruitment of the AAA peroxin Pex6p to peroxisomal membranes. *Mol Biol Cell* **14**: 2226–2236
- Böhmer C, Böhmer M, Bölker M & Sandrock B (2008) Cdc42 and the Ste20-like kinase Don3 act independently in triggering cytokinesis in *Ustilago maydis*. *Journal of Cell Science* **121**: 143–148
- Bölker M, Basse CW & Schirawski J (2008) *Ustilago maydis* secondary metabolism—From genomics to biochemistry. *Fungal Genetics and Biology* **45**: S88–S93
- Bölker M, Genin S, Lehmler C & Kahmann R (1995) Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Canadian Journal of Botany* **73**: 320–325
- Bölker M, Urban M, Kahmann R & others (1992) The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**: 441
- Bonnet C, Espagne E, Zickler D, Boissard S, Bourdais A & Berteaux-Lecellier V (2006) The peroxisomal import proteins PEX2, PEX5 and PEX7 are differently involved in *Podospora anserina* sexual cycle. *Molecular Microbiology* **62**: 157–169

- Bouchérié H, Bataille N, Fitch IT, Perrot M & Tuite MF (1995) Differential synthesis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides in stressed yeast cells. *FEMS Microbiology Letters* **125**: 127–133
- Bowman DH (1946) Sporidial fusion in *Ustilago maydis*. *J Agric Res* **72**, 233–243
- Brachmann A, König J, Julius C & Feldbrügge M (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics* **272**: 216–226
- Brachmann A, Weinzierl G, Kämper J & Kahmann R (2001) Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* **42**: 1047–1063
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254
- Brakhage AA, Spröte P, Al-Abdallah Q, Gehrke A, Plattner H & Tüncher A (2004) Regulation of penicillin biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **88**: 45–90
- Brefort T, Doehlemann G, Mendoza-Mendoza A, Reissmann S, Djamei A & Kahmann R (2009) *Ustilago maydis* as a pathogen. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 423–445
- Brocard C & Hartig A (2006) Peroxisome targeting signal 1: is it really a simple tripeptide? *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1565–73
- Brocard C, Kragler F, Simon MM, Schuster T & Hartig A (1994) The Tetratricopeptide Repeat Domain of the PAS10 Protein of *Saccharomyces cerevisiae* Is Essential for Binding the Peroxisomal Targeting Signal-SKL. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **204**: 1016–1022
- Broomfield PLE & Hargreaves JA (1992) A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Current Genetics* **22**: 117–121
- Buescher JM, Liebermeister W, Jules M, Uhr M, Muntel J, Botella E, Hessling B, Kleijn RJ, Le Chat L, Lecoite F & others (2012) Global network reorganization during dynamic adaptations of *Bacillus subtilis* metabolism. *Science* **335**: 1099–1103
- Burbulis IE & Winkel-Shirley B (1999) Interactions among enzymes of the Arabidopsis flavonoid biosynthetic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**: 12929–12934
- Cabantous S, Terwilliger TC & Waldo GS (2004) Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **23**: 102–107
- Chanda A, Roze L V, Pastor A, Frame MK & Linz JE (2009) Purification of a vesicle-vacuole fraction functionally linked to aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Microbiological Methods* **78**: 28–33

- Chittum HS, Lane WS, Carlson BA, Roller PP, Feng-Di T, Lung II, Lee BJ & Hatfield DL (1998) Rabbit β -globin is extended beyond its UGA stop codon by multiple suppressions and translational reading gaps. *Biochemistry* **37**: 10866–10870
- Christensen JJ (1963) Corn smut caused by *Ustilago maydis* *American Phytopathological Society Monogr* **2**
- Church GM & Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**: 1991–1995
- Clark AG, Eisen MB, Smith DR, Bergman CM, Oliver B, Markow TA, Kaufman TC, Kellis M, Gelbart W, Iyer VN & others (2007) Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature* **450**: 203–218
- Clausmeyer S, Stürzebecher R & Peters J (1999) An alternative transcript of the rat renin gene can result in a truncated prorenin that is transported into adrenal mitochondria. *Circulation Research* **84**: 337–344
- Copley SD (2012) Moonlighting is mainstream: Paradigm adjustment required. *BioEssays* **34**: 578–588
- Cregg JM, Van Klei IJ, Sulter GJ, Veenhuis M & Harder W (1990) Peroxisome-deficient mutants of *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **6**: 87–97
- Dam EB, Pleij CWA & Bosch L (1990) RNA pseudoknots: translational frameshifting and readthrough on viral RNAs. *Virus Genes* **4**: 121–136
- Dammai V & Subramani S (2001) The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* **105**: 187–196
- Danpure CJ (1997) Variable peroxisomal and mitochondrial targeting of alanine: glyoxylate aminotransferase in mammalian evolution and disease. *Bioessays* **19**: 317–326
- Daran-Lapujade P, Rossell S, Van Gulik WM, Luttik M a H, De Groot MJL, Slijper M, Heck AJR, Daran J-M, De Winde JH, Westerhoff H V, Pronk JT & Bakker BM (2007) The fluxes through glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* are predominantly regulated at posttranscriptional levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 15753–8
- Day PR & Anagnostakis SL (1973) The killer system in *Ustilago maydis*: heterokaryon transfer and loss of determinants. *Phytopathology* **63**: 1017–1018
- Day PR, Anagnostakis SL & Puhalla JE (1971) Pathogenicity resulting from mutation at the b locus of *Ustilago maydis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **68**: 533–535
- Dean R a, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK, Orbach MJ, Thon M, Kulkarni R, Xu J-R, Pan H, Read ND, Lee Y-H, Carbone I, Brown D, Oh YY, Donofrio N, Jeong JS, Soanes DM, Djonovic S, Kolomiets E, *et al* (2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* **434**: 980–6

- Dean R, Kan J, Pretorius ZA, Hammond-kosack KIME, Pietro ADI, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J & Foster GD (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **13**: 414–430
- Decker BL & Wickner WT (2006) Enolase activates homotypic vacuole fusion and protein transport to the vacuole in yeast. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 14523–14528
- Delgado ML, O'Connor JE, Azorín I, Renau-Piqueras J, Gil ML & Gozalbo D (1995) A mutation in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase alters endocytosis in CHO cells. *The Journal of Cell Biology* **130**: 1093–1104
- Delgado ML, O'Connor JE, Azorín I, Renau-Piqueras J, Gil ML & Gozalbo D (2001) The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TDH1, TDH2 and TDH3 genes are also cell wall proteins. *Microbiology* **147**: 411–417
- Delille HK & Schrader M (2008) Targeting of hFis1 to peroxisomes is mediated by Pex19p. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 31107–31115
- Desvergne B, Michalik L & Wahli W (2006) Transcriptional regulation of metabolism. *Physiological Reviews*: 465–514
- Deus-Neumann B & Zenk MH (1984) A highly selective alkaloid uptake system in vacuoles of higher plants. *Planta* **162**: 250–260
- Distel B, Erdmann R, Gould SJ, Blobel G, Crane DI, Cregg JM, Dodt G, Fujiki Y, Goodman JM, Just WW & others (1996) A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *The Journal of Cell Biology* **135**: 1–3
- Djamei A & Kahmann R (2012) *Ustilago maydis*: Dissecting the Molecular Interface between Pathogen and Plant. *PLoS Pathogens* **8**: e1002955
- Djamei A, Schipper K, Rabe F, Ghosh A, Vincon V, Kahnt J, Osorio S, Tohge T, Fernie AR, Feussner I & others (2011) Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478**: 395–398
- Doehlemann G, Van Der Linde K, Aßmann D, Schwammbach D, Hof A, Mohanty A, Jackson D & Kahmann R (2009) Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathogens* **5**: e1000290
- Doehlemann G, Wahl R, Vranes M, De Vries RP, Kämper J & Kahmann R (2008) Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *Journal of Plant Physiology* **165**: 29–40
- Doyle CE, Donaldson ME, Morrison EN & Saville BJ (2011) *Ustilago maydis* transcript features identified through full-length cDNA analysis. *Molecular Genetics and Genomics* **286**: 143–159

- Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G & Wahli W (1993) Positive regulation of the peroxisomal β -oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biology of the Cell* **77**: 67–76
- De Duve C (1969) Evolution of the peroxisome. *Annals of the New York Academy of Sciences* **168**: 369–381
- De Duve C (2007) The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nature Reviews Genetics* **8**: 395–403
- De Duve C & Baudhuin P (1966) Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiological Reviews* **46**: 323–57
- Ebbole DJ, Jin Y, Thon M, Pan H, Bhattarai E, Thomas T & Dean R (2004) Gene discovery and gene expression in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*: analysis of expressed sequence tags. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 1337–1347
- Edgecombe AE (1938) The effect of galactose on the growth of certain fungi. *Mycologia* **30**: 601–624
- Edwards SR, Braley R & Chaffin WL (2006) Enolase is present in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* **177**: 211–216
- Egea L, Aguilera L, Giménez R, Sorolla MA, Aguilar J, Badía J & Baldoma L (2007) Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: Interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen. *The International Journal of Biochemistry & Cell biology* **39**: 1190–1203
- Erdmann R & Blobel G (1995) Giant peroxisomes in oleic acid-induced *Saccharomyces cerevisiae* lacking the peroxisomal membrane protein Pmp27p. *The Journal of Cell Biology* **128**: 509–523
- Erdmann R & Blobel G (1996) Identification of Pex13p a peroxisomal membrane receptor for the PTS1 recognition factor. *The Journal of Cell biology* **135**: 111–121
- Erdmann R & Kunau WH (1992) A genetic approach to the biogenesis of peroxisomes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biochemistry and Function* **10**: 167–174
- Erdmann R, Veenhuis M, Mertens D & Kunau WH (1989) Isolation of peroxisome-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **86**: 5419–5423
- Fagarasanu A, Mast FD, Knoblauch B & Rachubinski RA (2010) Molecular mechanisms of organelle inheritance: lessons from peroxisomes in yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**: 644–654
- Fang Y, Morrell JC, Jones JM & Gould SJ (2004) PEX3 functions as a PEX19 docking factor in the import of class I peroxisomal membrane proteins. *The Journal of Cell Biology* **164**: 863–875

- Freitag J, Ast J & Bölker M (2012) Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi. *Nature* **485**: 522–525
- Freitag J, Lanver D, Böhmer C, Schink KO, Bölker M & Sandrock B (2011) Septation of infectious hyphae is critical for appressoria formation and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis*. *PLoS Pathogens* **7**: 15
- Fujiki Y, Matsuzono Y, Matsuzaki T, Fransen M & others (2006) Import of peroxisomal membrane proteins: the interplay of Pex3p-and Pex19p-mediated interactions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1639
- Fukuoka T, Kawamura M, Morita T, Imura T, Sakai H, Abe M & Kitamoto D (2008) A basidiomycetous yeast, *Pseudozyma crassa*, produces novel diastereomers of conventional mannosylerythritol lipids as glycolipid biosurfactants. *Carbohydrate Research* **343**: 2947–2955
- Gabaldón T (2010) Peroxisome diversity and evolution. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **365**: 765–73
- Gabaldon T, Snel B, Zimmeren F van, Hemrika W, Tabak H & Huynen M (2006) Origin and evolution of the peroxisomal proteome. *Biology Direct* **1**: 8
- Galagan JE, Henn MR, Ma LJ, Cuomo CA & Birren B (2005) Genomics of the fungal kingdom: insights into eukaryotic biology. *Genome Research* **15**: 1620–1631
- García-Muse T, Steinberg G & Pérez-Martín J (2003) Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell* **2**: 494–500
- Gatto GJ, Geisbrecht B V, Gould SJ & Berg JM (2000) Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nature Structural & Molecular Biology* **7**: 1091–1095
- Gee R, McGroarty E, Hsieh B, Wied DM & Tolbert NE (1974) Glycerol phosphate dehydrogenase in mammalian peroxisomes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **161**: 187–193
- Gillissen B, Bergemann J, Sandmann C, Schroeer B, Bölker M & Kahmann R (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**: 647–657
- Glover JR, Andrews DW & Rachubinski RA (1994) *Saccharomyces cerevisiae* peroxisomal thiolase is imported as a dimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 10541–10545
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M & others (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546–567
- Goh J, Jeon J, Kim KS, Park J, Park S-Y & Lee Y-H (2011) The PEX7-mediated peroxisomal import system is required for fungal development and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *PloS One* **6**: e28220

- Gonzalez NH, Felsner G, Schramm FD, Klingl A, Maier UG & Bolte K (2011) A single peroxisomal targeting signal mediates matrix protein import in diatoms. *PloS One* **6**: e25316
- Gould SJ, Kalish JE, Morrell JC, Bjorkman J, Urquhart AJ & Crane DI (1996) Pex13p is an SH3 protein of the peroxisome membrane and a docking factor for the predominantly cytoplasmic PTs1 receptor. *The Journal of Cell Biology* **135**: 85–95
- Gould SJ, Keller G a, Schneider M, Howell SH, Garrard LJ, Goodman JM, Distel B, Tabak H & Subramani S (1990) Peroxisomal protein import is conserved between yeast, plants, insects and mammals. *The EMBO Journal* **9**: 85–90
- Gould SJ, Keller GA, Hosken N, Wilkinson J & Subramani S (1989) A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. *The Journal of Cell Biology* **108**: 1657–1664
- Graham IA (2008) Seed storage oil mobilization. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 115–142
- Graham IA & Eastmond PJ (2002) Pathways of straight and branched chain fatty acid catabolism in higher plants. *Progress in Lipid Research* **41**: 156–181
- Gruber AR, Lorenz R, Bernhart SH, Neuböck R & Hofacker IL (2008) The vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Research* **36**: W70–W74
- Gründlinger M, Yasmin S, Lechner BE, Geley S, Schrettl M, Hynes M & Haas H (2013) Fungal siderophore biosynthesis is partially localized in peroxisomes. *Molecular Microbiology*
- Guerra-Giraldez C, Quijada L & Clayton CE (2002) Compartmentation of enzymes in a microbody, the glycosome, is essential in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science* **115**: 2651–2658
- Gurvitz A., Rottensteiner, H., Kilpeläinen, S. H., Hartig, A., Hiltunen, J. K., Binder, M., Dawes, I. W. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* Peroxisomal 2, 4-Dienoyl-CoA Reductase is encoded by the Oleate-inducible Gene SPS19. *Journal of Biological Chemistry*, 272(35), 22140–22147.
- Gurvitz A & Rottensteiner H (2006) The biochemistry of oleate induction: transcriptional upregulation and peroxisome proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1392–1402
- Haanstra JR, Van Tuijl A, Kessler P, Reijnders W, Michels PAM, Westerhoff H V, Parsons M & Bakker BM (2008) Compartmentation prevents a lethal turbo-explosion of glycolysis in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 17718–17723
- Hanahan D, Jessee J & Bloom FR (1991) Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology* **204**: 63–113
- Haselbeck RJ & McAlister-Henn L (1991) Isolation, nucleotide sequence, and disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding mitochondrial NADP(H)-specific isocitrate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 2339–2345

- Haskins RH (1950) Biochemistry of the Ustilaginales: I. Preliminary cultural studies of *Ustilago zeae*. *Canadian Journal of Research* **28**: 213–223
- Haskins RH & Thorn JA (1951) Biochemistry of the ustilaginales: VII. Antibiotic activity of ustilagic acid. *Canadian Journal of Botany* **29**: 585–592
- Haskins RH, Thorn JA & Boothroyd B (1955) Biochemistry of the Ustilaginales: XI. Metabolic products of *Ustilago zeae* in submerged culture. *Canadian Journal of Microbiology* **1**: 749–756
- Häusler T, Stierhof YD, Wirtz E & Clayton C (1996) Import of a DHFR hybrid protein into glycosomes in vivo is not inhibited by the folate-analogue aminopterin. *The Journal of Cell Biology* **132**: 311–324
- Heimel K, Scherer M, Schuler D & Kämper J (2010) The *Ustilago maydis* Clp1 protein orchestrates pheromone and b-dependent signaling pathways to coordinate the cell cycle and pathogenic development. *The Plant Cell* **22**: 2908–2922
- Van Helden J, lí del Olmo M & Pérez-Ortín JE (2000) Statistical analysis of yeast genomic downstream sequences reveals putative polyadenylation signals. *Nucleic Acids Research* **28**: 1000–1010
- Henke B, Girzalsky W, Berteaux-Lecellier V & Erdmann R (1998) IDP3 encodes a peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase required for the β -oxidation of unsaturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 3702–3711
- Hettema EH, Van Roermund CW, Distel B, Van den Berg M, Vilela C, Rodrigues-Pousada C, Wanders RJ & Tabak HF (1996) The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* **15**: 3813
- Hewald S (2005) Identifizierung und Charakterisierung zweier für die Produktion extrazellulärer Glykolipide verantwortlichen Gencluster in *Ustilago maydis*. *Dissertation*
- Hewald S, Josephs K & Bölker M (2005) Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 3033–3040
- Hewald S, Linne U, Scherer M, Marahiel MA, Kämper J & Bölker M (2006) Identification of a gene cluster for biosynthesis of mannosylerythritol lipids in the basidiomycetous fungus *Ustilago maydis*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5469–5477
- Heymans HSA, Schutgens RBH, Tan R, Van den Bosch H & Borst P (1983) Severe plasmalogen deficiency in tissues of infants without peroxisomes (Zellweger syndrome). *Nature* **306**: 69–70
- Hlubek A (2008) Die selektive Aktivierung der kleinen GTPasen Cdc42 und Rac1 durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren bestimmt deren Spezifität in *Ustilago maydis*. *Dissertation*

- Hoepfner D, Van den Berg M, Philippsen P, Tabak HF & Hettema EH (2001) A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* **155**: 979–990
- Hoepfner D, Schildknecht D, Braakman I, Philippsen P & Tabak HF (2005) Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* **122**: 85–95
- Hoffman CS & Winston F (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267–272
- Holliday R (1961) The genetics of *Ustilago maydis*. *Genet Res* **2**: 204–230
- Holliday R (2004) Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA Repair* **3**: 671–682
- Holloman WK (2011) Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination. *Nature Structural & Molecular Biology* **18**: 748–754
- Holloman WK, Schirawski J & Holliday R (2008) The homologous recombination system of *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology* **45 Suppl 1**: S31–S39
- Hooks KB, Turner JE, Graham IA, Runions J & Hooks MA (2012) GFP-tagging of Arabidopsis acyl-activating enzymes raises the issue of peroxisome-chloroplast import competition versus dual localization. *Journal of Plant Physiology*
- Huberts DHEW & Van der Klei IJ (2010) Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking. *Biochimica et Biophysica Acta* **1803**: 520–5
- Hussain NK, Yamabhai M, Ramjaun AR, Guy AM, Baranes D, O'Bryan JP, Der CJ, Kay BK & McPherson PS (1999) Splice variants of intersectin are components of the endocytic machinery in neurons and nonneuronal cells. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 15671–15677
- Hynes MJ, Draht OW & Davis MA (2002) Regulation of the *acuF* gene, encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* **184**: 183–190
- Hynes MJ, Murray SL, Khew GS & Davis MA (2008) Genetic analysis of the role of peroxisomes in the utilization of acetate and fatty acids in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **178**: 1355–1369
- Hynes MJ, Szewczyk E, Murray SL, Suzuki Y, Davis MA & Sealy-Lewis HM (2007) Transcriptional control of gluconeogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **176**: 139–150
- Idnurm A, Giles SS, Perfect JR & Heitman J (2007) Peroxisome function regulates growth on glucose in the basidiomycete fungus *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* **6**: 60–72

- Imazaki A, Tanaka A, Harimoto Y, Yamamoto M, Akimitsu K, Park P & Tsuge T (2010) Contribution of peroxisomes to secondary metabolism and pathogenicity in the fungal plant pathogen *Alternaria alternata*. *Eukaryotic Cell* **9**: 682–694
- Ishitani R, Sunaga K, Hirano A, Saunders P, Katsube N & Chuang DM (1996) Evidence that Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is Involved in Age-Induced Apoptosis in Mature Cerebellar Neurons in Culture. *Journal of Neurochemistry* **66**: 928–935
- Islinger M, Cardoso MJR & Schrader M (2010) Be different—the diversity of peroxisomes in the animal kingdom. *Biochimica et Biophysica Acta* **1803**: 881–897
- Issemann I, Green S & others (1990) Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**: 645
- Jedd G & Chua NH (2000) A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nature Cell Biology* **2**: 226–231
- Jones JM, Morrell JC & Gould SJ (2004) PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class I peroxisomal membrane proteins. *The Journal of Cell Biology* **164**: 57–67
- Jones JM, Nau K, Geraghty MT, Erdmann R & Gould SJ (1999) Identification of peroxisomal acyl-CoA thioesterases in yeast and humans. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 9216–9223
- Juneau K, Palm C, Miranda M & Davis RW (2007) High-density yeast-tiling array reveals previously undiscovered introns and extensive regulation of meiotic splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 1522–1527
- Jung S, Marelli M, Rachubinski RA, Goodlett DR & Aitchison JD (2010) Dynamic changes in the subcellular distribution of Gpd1p in response to cell stress. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 6739–6749
- Jungreis I, Lin MF, Spokony R, Chan CS, Negre N, Victorsen A, White KP & Kellis M (2011) Evidence of abundant stop codon readthrough in *Drosophila* and other metazoa. *Genome Research* **21**: 2096–2113
- Kabran P, Rossignol T, Gaillardin C, Nicaud JM & Neuvéglise C (2012) Alternative Splicing Regulates Targeting of Malate Dehydrogenase in *Yarrowia lipolytica*. *DNA Research* **19**: 231–244
- Kämper J (2004) A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics* **271**: 103–110
- Kämper J, Kahmann R, Bölker M, Ma LJ, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Müller O & others (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**: 97–101

- Kämper J, Reichmann M, Romeis T, Bölker M & Kahmann R (1995) Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**: 73–83
- Karkhoff-Schweizer RA & Knull HR (1987) Demonstration of tubulin-glycolytic enzyme interactions using a novel electrophoretic approach. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **146**: 3252–3261
- Karniely S, Rayzner A, Sass E & Pines O (2006) α -Complementation as a probe for dual localization of mitochondrial proteins. *Experimental Cell Research* **312**: 3835–3846
- Karnik SK & Trelease RN (2005) Arabidopsis peroxin 16 coexists at steady state in peroxisomes and endoplasmic reticulum. *Plant Physiology* **138**: 1967–1981
- Keller GA, Gould S, Deluca M & Subramani S (1987) Firefly luciferase is targeted to peroxisomes in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**: 3264–3268
- Keller NP, Turner G & Bennett JW (2005) Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 937–947
- Kempken F (2013) Alternative splicing in ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 1–7
- Keren H, Lev-Maor G & Ast G (2010) Alternative splicing and evolution: diversification, exon definition and function. *Nature Reviews Genetics* **11**: 345–355
- Kiel JAKW, Van den Berg MA, Fusetti F, Poolman B, Bovenberg RAL, Veenhuis M & Van der Klei IJ (2009) Matching the proteome to the genome: the microbody of penicillin-producing *Penicillium chrysogenum* cells. *Functional & Integrative Genomics* **9**: 167–184
- Kiel JAKW, Veenhuis M & Van Der Klei IJ (2006) PEX genes in fungal genomes: common, rare or redundant. *Traffic* **7**: 1291–1303
- Kikuchi M, Hatano N, Yokota S, Shimozawa N, Imanaka T & Taniguchi H (2004) Proteomic analysis of rat liver peroxisome: presence of peroxisome-specific isozyme of Lon protease. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 421–428
- Kim PK, Mullen RT, Schumann U & Lippincott-Schwartz J (2006) The origin and maintenance of mammalian peroxisomes involves a de novo PEX16-dependent pathway from the ER. *The Journal of Cell Biology* **173**: 521–532
- Kimura A, Takano Y, Furusawa I & Okuno T (2001) Peroxisomal metabolic function is required for appressorium-mediated plant infection by *Colletotrichum lagenarium*. *The Plant Cell* **13**: 1945–1957
- Kitamoto D, Yanagishita H, Haraya K & Kitamoto HK (1998) Contribution of a chain-shortening pathway to the biosynthesis of the fatty acids of mannosylerythritol lipid (biosurfactant) in the yeast *Candida antarctica*: effect of β -oxidation inhibitors on biosurfactant synthesis. *Biotechnology Letters* **20**: 813–818

- Klagges BRE, Heimbeck G, Godenschwege TA, Hofbauer A, Pflugfelder GO, Reifegerste R, Reisch D, Schaupp M, Buchner S & Buchner E (1996) Invertebrate synapsins: a single gene codes for several isoforms in *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience* **16**: 3154–3165
- Van der Klei IJ & Veenhuis M (2006a) PTS1-independent sorting of peroxisomal matrix proteins by Pex5p. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1794–1800
- Van der Klei IJ & Veenhuis M (2006b) Yeast and filamentous fungi as model organisms in microbody research. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1364–1373
- Klose J & Kronstad JW (2006) The multifunctional β -oxidation enzyme is required for full symptom development by the biotrophic maize pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell* **5**: 2047–2061
- Knox C, Sass E, Neupert W & Pines O (1998) Import into mitochondria, folding and retrograde movement of fumarate in yeast. *Journal of Biological Chemistry* **273**: 25587–25593
- Knudson L (1915) Toxicity of galactose for certain of the higher plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **2**: 659–666
- Koch A, Yoon Y, Bonekamp NA, McNiven MA & Schrader M (2005) A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Molecular Biology of the Cell* **16**: 5077–5086
- Kohlwein SD, Veenhuis M & Van der Klei IJ (2013) Lipid Droplets and Peroxisomes: Key Players in Cellular Lipid Homeostasis or A Matter of Fat—Store'em Up or Burn'em Down. *Genetics* **193**: 1–50
- Kretschmer M, Klose J & Kronstad JW (2012) Defects in mitochondrial and peroxisomal β -oxidation influence virulence in the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Eukaryotic Cell* **11**: 1055–1066
- Kunze M, Kragler F, Binder M, Hartig A & Gurvitz A (2002) Targeting of malate synthase 1 to the peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae* cells depends on growth on oleic acid medium. *European Journal of Biochemistry* **269**: 915–922
- Kunze M, Neuberger G, Maurer-Stroh S, Ma J, Eck T, Braverman N, Schmid JA, Eisenhaber F & Berger J (2011) Structural Requirements for Interaction of Peroxisomal Targeting Signal 2 and Its Receptor PEX7. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 45048–45062
- Kunze M, Pracharoenwattana I, Smith SM & Hartig A (2006) A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1441–1452
- Ladendorf O, Brachmann A & Kämper J (2003) Heterologous transposition in *Ustilago maydis*. *Molecular Genetics and Genomics* **269**: 395–405
- Laemmli UK (1970) Denaturing (SDS) discontinuous gel electrophoresis. *Nature* **227**: 680–685

- Lam S, Yoda N & Schekman R (2010) A vesicle carrier that mediates peroxisome protein traffic from the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 21523–21528
- Lanver D, Mendoza-Mendoza A, Brachmann A & Kahmann R (2010) Sho1 and Msb2-Related Proteins Regulate Appressorium Development in the Smut Fungus *Ustilago maydis*. *The Plant Cell* **22**: 2085–2101
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R & others (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947–2948
- Lata GF, Mamrak F, Bloch P & Baker B (1977) An electron microscopic and enzymic study of rat liver peroxisomal nucleoid core and its association with urate oxidase. *Journal of Supramolecular Structure* **7**: 419–434
- Lazarow PB (2006) The import receptor Pex7p and the PTS2 targeting sequence. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1599–1604
- Lazarow PB & De Duve C (1976) A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **73**: 2043–2046
- Lazo O, Contreras M & Singh I (1990) Topographical localization of peroxisomal acyl-CoA ligases: differential localization of palmitoyl-CoA and lignoceroyl-CoA ligases. *Biochemistry* **29**: 3981–3986
- Der Leij I, Franse MM, Elgersma Y, Distel B & Tabak HF (1993) PAS10 is a tetratricopeptide-repeat protein that is essential for the import of most matrix proteins into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**: 11782–11786
- Leng P, Klatte DH, Steck TL, Schumann G & Boeke JD (1998) Skipper, an LTR retrotransposon of *Dictyostelium*. *Nucleic Acids Research* **26**: 2008–2015
- Letunic I & Bork P (2007) Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics* **23**: 127–128
- Lewin TM, Van Horn CG, Krisans SK & Coleman RA (2002) Rat liver acyl-CoA synthetase 4 is a peripheral-membrane protein located in two distinct subcellular organelles, peroxisomes, and mitochondrial-associated membrane. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **404**: 263–270
- Li G & Rice CM (1993) The signal for translational readthrough of a UGA codon in Sindbis virus RNA involves a single cytidine residue immediately downstream of the termination codon. *Journal of Virology* **67**: 5062–5067
- Lingner T, Kataya AR, Antonicelli GE, Benichou A, Nilssen K, Chen X-Y, Siemsen T, Morgenstern B, Meinicke P & Reumann S (2011) Identification of novel plant peroxisomal targeting signals by a

- combination of machine learning methods and in vivo subcellular targeting analyses. *The Plant Cell* **23**: 1556–1572
- Liu H, Tan X, Veenhuis M, McCollum D & Cregg JM (1992) An efficient screen for peroxisome-deficient mutants of *Pichia pastoris*. *Journal of Bacteriology* **174**: 4943–4951
- Loftus BJ, Fung E, Roncaglia P, Rowley D, Amedeo P, Bruno D, Vamathevan J, Miranda M, Anderson IJ, Fraser JA & others (2005) The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science* **307**: 1321–1324
- Maeting I, Schmidt G, Sahm H, Revuelta JL, Stierhof Y-D, Stahmann K & others (1999) Isocitrate lyase of *Ashbya gossypii*—transcriptional regulation and peroxisomal localization. *FEBS Letters* **444**: 15–21
- Maggio-Hall LA & Keller NP (2004) Mitochondrial β -oxidation in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* **54**: 1173–1185
- Maggio-Hall LA, Wilson RA & Keller NP (2005) Fundamental contribution of β -oxidation to polyketide mycotoxin production in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 783–793
- Magliano P, Flipphi M, Arpat BA, Delessert S & Poirier Y (2011) Contributions of the Peroxisome and β -Oxidation Cycle to Biotin Synthesis in Fungi. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 42133–42140
- Managadze D, Würtz C, Wiese S, Meyer HE, Niehaus G, Erdmann R, Warscheid B & Rottensteiner H (2010) A proteomic approach towards the identification of the matrix protein content of the two types of microbodies in *Neurospora crassa*. *Proteomics* **10**: 3222–3234
- Mano S, Hayashi M & Nishimura M (2000) A leaf-peroxisomal protein, hydroxypyruvate reductase, is produced by light-regulated alternative splicing. *Cell Biochemistry and Biophysics* **32**: 147–154
- Marelli M, Smith JJ, Jung S, Yi E, Nesvizhskii AI, Christmas RH, Saleem RA, Tam YYC, Fagarasanu A, Goodlett DR, Aebersold R, Rachubinski RA & Aitchison JD (2004) Quantitative mass spectrometry reveals a role for the GTPase Rho1p in actin organization on the peroxisome membrane. *The Journal of Cell Biology* **167**: 1099–1112
- Marshall AN, Montealegre MC, Jiménez-López C, Lorenz MC & Van Hoof A (2013) Alternative Splicing and Subfunctionalization Generates Functional Diversity in Fungal Proteomes. *PLoS Genetics* **9**: e1003376
- Marshall PA, Krimkevich YI, Lark RH, Dyer JM, Veenhuis M & Goodman JM (1995) Pmp27 promotes peroxisomal proliferation. *The Journal of Cell Biology* **129**: 345–355
- Martinez-Espinoza AD, Garcia-Pedrajas MD & Gold SE (2002) The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genetics and Biology* **35**: 1–20
- Masters C (1997) Gluconeogenesis and the peroxisome. *Molecular and Cellular Biochemistry* **166**: 159–168

- Matlin AJ, Clark F & Smith CWJ (2005) Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**: 386–398
- Mayer BJ (2001) SH3 domains: complexity in moderation. *Journal of Cell Science* **114**: 1253–1263
- McAlister L & Holland MJ (1985) Differential expression of the three yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *Journal of Biological Chemistry* **260**: 15019–15027
- McAlister-Henn L, Steffan JS, Minard KI & Anderson SL (1995) Expression and function of a mislocalized form of peroxisomal malate dehydrogenase (MDH3) in yeast. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 21220–21225
- McClelland GB, Khanna S, González GF, Eric Butz C & Brooks GA (2003) Peroxisomal membrane monocarboxylate transporters: evidence for a redox shuttle system? *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304**: 130–135
- McKee T & McKee JR (2009) *Biochemistry: The Molecular Basis of Life* Oxford University Press
- McNew JA & Goodman JM (1994) An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *The Journal of Cell Biology* **127**: 1245–1257
- Meinecke M, Cizmowski C, Schliebs W, Krüger V, Beck S, Wagner R & Erdmann R (2010) The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nature Cell Biology* **12**: 273–277
- Menand B, Marechal-Drouard L, Sakamoto W, Dietrich A & Wintz H (1998) A single gene of chloroplast origin codes for mitochondrial and chloroplastic methionyl-tRNA synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 11014–11019
- Mendgen K & Hahn M (2002) Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science* **7**: 352–356
- Mendoza-Mendoza A, Berndt P, Djamei A, Weise C, Linne U, Marahiel M, Vraneš M, Kämper J & Kahmann R (2009) Physical-chemical plant-derived signals induce differentiation in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* **71**: 895–911
- Meyer T, Hölscher C, Schwöppe C & Von Schaewen A (2011) Alternative targeting of *Arabidopsis* plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase G6PD1 involves cysteine-dependent interaction with G6PD4 in the cytosol. *The Plant Journal* **66**: 745–758
- Michels PAM, Bringaud F, Herman M & Hannaert V (2006) Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1463–1477
- Mielnichuk N, Sgarlata C & Pérez-Martín J (2009) A role for the DNA-damage checkpoint kinase Chk1 in the virulence program of the fungus *Ustilago maydis*. *Journal of Cell Science* **122**: 4130–4140

- Minard KI & McAlister-Henn L (1991) Isolation, nucleotide sequence analysis, and disruption of the MDH2 gene from *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for three isozymes of yeast malate dehydrogenase. *Molecular and Cellular Biology* **11**: 370–380
- Miura N, Kirino A, Endo S, Morisaka H, Kuroda K, Takagi M & Ueda M (2012) Tracing Putative Trafficking of the Glycolytic Enzyme Enolase via SNARE-Driven Unconventional Secretion. *Eukaryotic Cell* **11**: 1075–1082
- Moore PA, Sagliocco FA, Wood RM & Brown AJ (1991) Yeast glycolytic mRNAs are differentially regulated. *Molecular and Cellular Biology* **11**: 5330–5337
- Morita T, Fukuoka T, Imura T & Kitamoto D (2013a) Production of mannosylerythritol lipids and their application in cosmetics. *Applied Microbiology and Biotechnology*: 1–10
- Morita T, Koike H, Koyama Y, Hagiwara H, Ito E, Fukuoka T, Imura T, Machida M & Kitamoto D (2013b) Genome sequence of the basidiomycetous yeast *Pseudozyma antarctica* T-34, a producer of the glycolipid biosurfactants mannosylerythritol lipids. *Genome Announcements*
- Mortimer RK & Johnston JR (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**: 35–43
- Motley AM & Hettema EH (2007) Yeast peroxisomes multiply by growth and division. *The Journal of Cell Biology* **178**: 399–410
- Motley AM, Hettema EH, Ketting R, Plasterk R & Tabak HF (2000) *Caenorhabditis elegans* has a single pathway to target matrix proteins to peroxisomes. *EMBO Reports* **1**: 40–46
- Muirhead H & Watson H (1992) Glycolytic enzymes: from hexose to pyruvate. *Current Opinion in Structural Biology* **2**: 870–876
- Müller WH, Bovenberg RAL, Groothuis MH, Kattevilder F, Smaal EB, Der Voort LHM & Verkleij AJ (1992) Involvement of microbodies in penicillin biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **1116**: 210–213
- Müller WH, Van Der Krift TP, Krouwer AJ, Wösten HA, Van Der Voort LH, Smaal EB & Verkleij AJ (1991) Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *The EMBO Journal* **10**: 489–495
- Mullis KB, Faloona FA, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich H & others (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* pp 263–273.

- Nagotu S, Saraya R, Otzen M, Veenhuis M & Van der Klei IJ (2008) Peroxisome proliferation in *Hansenula polymorpha* requires Dnm1p which mediates fission but not de novo formation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1783**: 760–769
- Nagy E & Maquat LE (1998) A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 198–199
- Namy O, Duchateau-Nguyen G, Hatin I, Hermann-Le Denmat S, Termier M & Rousset JP (2003) Identification of stop codon readthrough genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* **31**: 2289–2296
- Namy O, Duchateau-Nguyen G & Rousset JP (2002) Translational readthrough of the PDE2 stop codon modulates cAMP levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **43**: 641–652
- Neuberger G, Maurer-Stroh S, Eisenhaber B, Hartig A & Eisenhaber F (2003a) Prediction of peroxisomal targeting signal 1 containing proteins from amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology* **328**: 581–592
- Neuberger G, Maurer-Stroh S, Eisenhaber B, Hartig A, Eisenhaber F & others (2003b) Motif refinement of the peroxisomal targeting signal 1 and evaluation of taxon-specific differences. *Journal of Molecular Biology* **328**: 567
- Nuttall JM, Motley A & Hettema EH (2011) Peroxisome biogenesis: recent advances. *Current Opinion in Cell Biology* **23**: 421–426
- O'Bryan JP (2010) Intersecting pathways in cell biology. *Science Signalling* **3**: re10
- Oda T, Yanagisawa M & Ichiyama A (1982) Induction of serine: pyruvate aminotransferase in rat liver organelles by glucagon and a high-protein diet. *Journal of Biochemistry* **91**: 219–232
- Okar DA, Lange AJ, Manzano À, Navarro-Sabatè A, Riera L & Bartrons R (2001) PFK-2/FBPase-2: maker and breaker of the essential biofactor fructose-2,6-bisphosphate. *Trends in Biochemical Sciences* **26**: 30–35
- Oliveira AP, Ludwig C, Picotti P, Kogadeeva M, Aebersold R & Sauer U (2012) Regulation of yeast central metabolism by enzyme phosphorylation. *Molecular Systems Biology* **8**: 623
- Opperdoes FR & Borst P (1977) Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Letters* **80**: 360
- Otzen M, Perband U, Wang D, Baerends RJS, Kunau WH, Veenhuis M & Der Klei IJ (2004) *Hansenula polymorpha* Pex19p is essential for the formation of functional peroxisomal membranes. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 19181–19190

- Pacho F, Zambruno G, Calabresi V, Kiritsi D & Schneider H (2011) Efficiency of translation termination in humans is highly dependent upon nucleotides in the neighbourhood of a (premature) termination codon. *Journal of Medical Genetics* **48**: 640–644
- Palmieri L, Rottensteiner H, Girzalsky W, Scarcia P, Palmieri F & Erdmann R (2001) Identification and functional reconstitution of the yeast peroxisomal adenine nucleotide transporter. *The EMBO Journal* **20**: 5049–5059
- Peeters N & Small I (2001) Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* **1541**: 54–63
- Perutz MF (1990) Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. *Cambridge University Press*
- Platta HW & Erdmann R (2007) Peroxisomal dynamics. *Trends in Cell Biology* **17**: 474–484
- Platta HW, Grunau S, Rosenkranz K, Girzalsky W & Erdmann R (2005) Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. *Nature Cell Biology* **7**: 817–822
- Platta HW, El Magraoui F, Bäumer BE, Schlee D, Girzalsky W & Erdmann R (2009) Pex2 and Pex12 function as protein-ubiquitin ligases in peroxisomal protein import. *Molecular and Cellular Biology* **29**: 5505–5516
- Platta HW, El Magraoui F, Schlee D, Grunau S, Girzalsky W & Erdmann R (2007) Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. *The Journal of Cell Biology* **177**: 197–204
- Plaxton W (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annual Review of Plant Biology*: 185–214
- Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T & Hiltunen JK (2006) Peroxisomal β -oxidation—a metabolic pathway with multiple functions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1413–1426
- Poulos A, Singh H, Paton B, Sharp P & Derwas N (1986) Accumulation and defective β -oxidation of very long chain fatty acids in Zellweger's syndrome, adrenoleukodystrophy and Refsum's disease variants. *Clinical Genetics* **29**: 397–408
- Puhalla JE (1970) Genetic studies of the b incompatibility locus of *Ustilago maydis*. *Genetics Research* **16**: 229–232
- Ramos-Pamplona M & Naqvi NI (2006) Host invasion during rice-blast disease requires carnitine-dependent transport of peroxisomal acetyl-CoA. *Molecular Microbiology* **61**: 61–75
- Rapp S, Saffrich R, Anton M, Jakle U, Ansorge W, Gorgas K & Just WW (1996) Microtubule-based peroxisome movement. *Journal of Cell Science* **109**: 837–849

- Rehling P, Marzioch M, Niesen F, Wittke E, Veenhuis M & Kunau WH (1996) The import receptor for the peroxisomal targeting signal 2 (PTS2) in *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the PAS7 gene. *The EMBO Journal* **15**: 2901
- Renicke C, Schuster D, Usherenko S, Essen L-O & Taxis C (2013) A LOV2 Domain-Based Optogenetic Tool to Control Protein Degradation and Cellular Function. *Chemistry & Biology* **20**: 619–626
- Reumann S, Babujee L & Ma C (2007) Proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *The Plant Cell* **19**: 3170–3193
- Reumann S, Quan S, Aung K, Yang P, Manandhar-Shrestha K, Holbrook D, Linka N, Switzenberg R, Wilkerson CG, Weber APM & others (2009) In-depth proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes combined with in vivo subcellular targeting verification indicates novel metabolic and regulatory functions of peroxisomes. *Plant Physiology* **150**: 125–143
- Rhodin JAG (1954) Correlation of Ultrastructural Organization: And Function in Normal and Experimentally Changed Proximal Convolute Tubule Cells of the Mouse Kidney: an Electron Microscopic Study Department of Anatomy, Karolinska Institutet
- Robinson DN & Cooley L (1997) Examination of the function of two kelch proteins generated by stop codon suppression. *Development* **124**: 1405–1417
- Van Roermund CW, Elgersma Y, Singh N, Wanders RJ & Tabak HF (1995) The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD (H) and acetyl-CoA under in vivo conditions. *The EMBO Journal* **14**: 3480
- Van Roermund CWT, Drissen R, Van den Berg M, Ijlst L, Hettema EH, Tabak HF, Waterham HR & Wanders RJA (2001) Identification of a peroxisomal ATP carrier required for medium-chain fatty acid β -oxidation and normal peroxisome proliferation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 4321–4329
- Rossman KL, Der CJ & Sondek J (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**: 167–180
- Rottensteiner H, Kramer A, Lorenzen S, Stein K, Landgraf C, Volkmer-Engert R & Erdmann R (2004) Peroxisomal membrane proteins contain common Pex19p-binding sites that are an integral part of their targeting signals. *Molecular Biology of the Cell* **15**: 3406–3417
- Rowell JB (1954) Genetics of *Ustilago zeae* in relation to basic problems of its pathogenicity. *Phytopathology* **44**: 356–362
- Roze L V, Chanda A & Linz JE (2011) Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: A new understanding of established cellular processes. *Fungal Genetics and Biology* **48**: 35–48

- Rucktäschel R, Girzalsky W & Erdmann R (2011) Protein import machineries of peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1808**: 892–900
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB & Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487–491
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA & Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350–1354
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual Argentine J (ed) *Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**: 5463–5467
- Sauer U (2006) Metabolic networks in motion: ¹³C-based flux analysis. *Molecular Systems Biology* **2**: 62
- Scherer M, Heimel K, Starke V & Kämper J (2006) The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *The Plant Cell* **18**: 2388–2401
- Schirawski J, Mannhaupt G, Münch K, Brefort T, Schipper K, Doeblemann G, Di Stasio M, Rössel N, Mendoza-Mendoza A, Pester D & others (2010) Pathogenicity determinants in smut fungi revealed by genome comparison. *Science* **330**: 1546–1548
- Schirmer T & Evans PR (1990) Structural basis of the allosteric behaviour of phosphofructokinase. *Nature* **343**: 140–145
- Schluter A, Ripp R, Fourcade S, Mandel JL, Poch O & Pujol A (2006) The Evolutionary Origin of Peroxisomes: An ER-Peroxisome Connection. *Mol Biol Evol* **23**(4): 838–845
- Schuetz R, Zamboni N, Zampieri M, Heinemann M & Sauer U (2012) Multidimensional Optimality of Microbial Metabolism. *Science* **336**: 601–604
- Schulz B, Banuett F, Dahl M, Schlesinger R, Schäfer W, Martin T, Herskowitz I & Kahmann R (1990) The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**: 295–306
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE & Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **22**: 1567–1572
- Shen YQ & Burger G (2009) Plasticity of a key metabolic pathway in fungi. *Functional & Integrative Genomics* **9**: 145–151

- Sichting M, Schell-Steven A, Prokisch H, Erdmann R & Rottensteiner H (2003) Pex7p and Pex20p of *Neurospora crassa* function together in PTS2-dependent protein import into peroxisomes. *Molecular Biology of the Cell* **14**: 810–821
- Singh I, Moser AE, Goldfischer S & Moser HW (1984) Lignoceric acid is oxidized in the peroxisome: implications for the Zellweger cerebro-hepato-renal syndrome and adrenoleukodystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**: 4203–4207
- Singh R, Green MR & others (1993) Sequence-specific binding of transfer RNA by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Science* **259**: 365
- Skarzynski T, Moody PCE & Wonacott AJ (1987) Structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **193**: 171–187
- Snetselaar KM (1993) Microscopic Observation of *Ustilago maydis* Mating Interactions. *Experimental Mycology* **17**: 345–355
- Snetselaar KM & Mims CW (1992) Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*: 193–203
- Snetselaar KM & Mims CW (1993) Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**: 843
- Snetselaar KM & Mims CW (1994) Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycological Research* **98**: 347–355
- Soundararajan S, Jedd G, Li X, Ramos-Pamplona M, Chua NH & Naqvi NI (2004) Woronin body function in *Magnaporthe grisea* is essential for efficient pathogenesis and for survival during nitrogen starvation stress. *The Plant Cell* **16**: 1564–1574
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 503–517
- Spellig T, Bölker M, Lottspeich F, Frank RW & Kahmann R (1994) Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *The EMBO Journal* **13**: 1620
- Spellig T, Bottin A & Kahmann R (1996) Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular and General Genetics* **252**: 503–509
- Spröte P, Brakhage AA & Hynes MJ (2009) Contribution of peroxisomes to penicillin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **8**: 421–423
- Sriram G, Martinez JA, McCabe ERB, Liao JC & Dipple KM (2005) Single-gene disorders: what role could moonlighting enzymes play? *The American Journal of Human Genetics* **76**: 911–924

- Stalder L & Mühlemann O (2008) The meaning of nonsense. *Trends in Cell Biology* **18**: 315–321
- Stark A, Lin MF, Kheradpour P, Pedersen JS, Parts L, Carlson JW, Crosby MA, Rasmussen MD, Roy S, Deoras AN & others (2007) Discovery of functional elements in 12 *Drosophila* genomes using evolutionary signatures. *Nature* **450**: 219–232
- Stein I, Peleg Y, Even-Ram S & Pines O (1994) The single translation product of the FUM1 gene (fumarase) is processed in mitochondria before being distributed between the cytosol and mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **14**: 4770–4778
- Steinberg G & Perez-Martin J (2008) *Ustilago maydis*, a new fungal model system for cell biology. *Trends in Cell Biology* **18**: 61–67
- Steinberg G & Schuster M (2011) The dynamic fungal cell. *Fungal Biology Reviews* **25**: 14–37
- Steneberg P, Englund C, Kronhamn J, Weaver TA & Samakovlis C (1998) Translational readthrough in the *hdc* mRNA generates a novel branching inhibitor in the *Drosophila* trachea. *Genes & Development* **12**: 956–967
- Steneberg P & Samakovlis C (2001) A novel stop codon readthrough mechanism produces functional Headcase protein in *Drosophila* trachea. *EMBO Reports* **2**: 593–7
- Strijbis K, Den Burg J, F Visser W, Den Berg M & Distel B (2012) Alternative splicing directs dual localization of *Candida albicans* 6-phosphogluconate dehydrogenase to cytosol and peroxisomes. *FEMS Yeast Research* **12** (1): 61–8
- Strijbis K & Distel B (2010) Intracellular acetyl unit transport in fungal carbon metabolism. *Eukaryotic Cell* **9**: 1809–1815
- Sullivan DT, MacIntyre R, Fuda N, Fiori J, Barrilla J & Ramizel L (2003) Analysis of glycolytic enzyme co-localization in *Drosophila* flight muscle. *Journal of Experimental Biology* **206**: 2031–2038
- Szewczyk E, Andrianopoulos A, Davis MA & Hynes MJ (2001a) A Single Gene Produces Mitochondrial, Cytoplasmic, and Peroxisomal NADP-dependent Isocitrate Dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 37722–37729
- Szewczyk E, Andrianopoulos A, Davis MA & Hynes MJ (2001b) A single gene produces mitochondrial, cytoplasmic, and peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 2339–2345
- Tabak HF, Hoepfner D, V.d. Zand A, Geuze HJ, Braakman I & Huynen MA (2006) Formation of peroxisomes: Present and past. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1647–1654

- Tabak HF, Van der Zand A & Braakman I (2008) Peroxisomes: minted by the ER. *Current Opinion in Cell Biology* **20**: 393–400
- Tanabe Y, Maruyama J, Yamaoka S, Yahagi D, Matsuo I, Tsutsumi N & Kitamoto K (2011) Peroxisomes are involved in biotin biosynthesis in *Aspergillus* and *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 30455–30461
- Tanaka A & Ueda M (1993) Assimilation of alkanes by yeasts: functions and biogenesis of peroxisomes. *Mycological Research* **97**: 1025–1044
- Teichmann B, Linne U, Hewald S, Marahiel MA & Bölker M (2007) A biosynthetic gene cluster for a secreted cellobiose lipid with antifungal activity from *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* **66**: 525–533
- Terlecky SR, Nuttley WM, McCollum D, Sock E & Subramani S (1995) The *Pichia pastoris* peroxisomal protein PAS8p is the receptor for the C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *The EMBO Journal* **14**: 3627
- Teusink B, Walsh MC, Van Dam K, Westerhoff H V & others (1998) The danger of metabolic pathways with turbo design. *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 162
- Thoms S & Erdmann R (2005) Dynamin-related proteins and Pex11 proteins in peroxisome division and proliferation. *FEBS Journal* **272**: 5169–5181
- Titorenko VI & Rachubinski RA (1998) Mutants of the Yeast *Yarrowia lipolytica* Defective in Protein Exit from the Endoplasmic Reticulum Are Also Defective in Peroxisome Biogenesis. *Molecular and Cellular Biology* **18**: 2789–2803
- True HL & Lindquist SL (2000) A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature* **407**: 477–484
- Tsien RY (1998) The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* **67**: 509–544
- Tsukada H, Mochizuki Y & Fujiwara S (1966) The nucleoids of rat liver cell microbodies fine structure and enzymes. *The Journal of Cell Biology* **28**: 449–460
- Valenciano S, De Lucas JR, Pedregosa A, Monistrol IF & Laborda F (1996) Induction of β -oxidation enzymes and microbody proliferation in *Aspergillus nidulans*. *Archives of Microbiology* **166**: 336–341
- Veenhuis M, Dijken JP, Pilon SAF & Harder W (1978) Development of crystalline peroxisomes in methanol-grown cells of the yeast *Hansenula polymorpha* and its relation to environmental conditions. *Archives of Microbiology* **117**: 153–163
- Veenhuis M, Mateblowski M, Kunau WH & Harder W (1987) Proliferation of microbodies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **3**: 77–84

- Vellieux FM, Hajdu J, Verlinde CL, Groendijk H, Read RJ, Greenhough TJ, Campbell JW, Kalk KH, Littlechild JA & Watson HC (1993) Structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* determined from Laue data. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**: 2355–2359
- Visser WF, Van Roermund CWT, Ijlst L, Hellingwerf KJ, Waterham HR & Wanders RJA (2006) First identification of a 2-ketoglutarate/isocitrate transport system in mammalian peroxisomes and its characterization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **348**: 1224–1231
- Visser WF, Van Roermund CWT, Ijlst L, Waterham HR & Wanders RJA (2007) Metabolite transport across the peroxisomal membrane. *Biochemical Journal* **401**: 365
- Visser WF, Van Roermund CWT, Waterham HR & Wanders RJA (2002) Identification of human PMP34 as a peroxisomal ATP transporter. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **299**: 494–497
- Voet D, Beck-Sickinger A, Voet JG & Pratt CW (2010) *Lehrbuch der Biochemie Wiley VCH*
- Vongsamphanh R, Fortier PK & Ramotar D (2001) Pir1p mediates translocation of the yeast Apn1p endonuclease into the mitochondria to maintain genomic stability. *Molecular and Cellular Biology* **21**: 1647–1655
- Voorn-Brouwer T, Van der Leij I, Hemrika W, Distel B & Tabak HF (1993) Sequence of the PAS8 gene, the product of which is essential for biogenesis of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1216**: 325–328
- Walton PA, Hill PE & Subramani S (1995) Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Molecular Biology of the Cell* **6**: 1253–1263
- Wanders RJA & Waterham HR (2006) Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annual Review Biochemistry* **75**: 295–332
- Wang D, Visser N V, Veenhuis M & Der Klei IJ (2003) Physical interactions of the peroxisomal targeting signal 1 receptor pex5p, studied by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 43340–43345
- Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP & Burge CB (2008) Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**: 470–476
- Wickner W & Schekman R (2005) Protein translocation across biological membranes. *Science* **310**: 1452–1456
- Williams C, Van den Berg M, Geers E & Distel B (2008) Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **374**: 620–624

- Wilson RA & Talbot NJ (2009) Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nature Reviews Microbiology* **7**: 185–195
- Winterberg B, Uhlmann S, Linne U, Lessing F, Marahiel MA, Eichhorn H, Kahmann R & Schirawski J (2010) Elucidation of the complete ferrichrome A biosynthetic pathway in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology* **75**: 1260–1271
- Wojtas K, Slepecky N, Von Kalm L & Sullivan D (1997) Flight muscle function in *Drosophila* requires colocalization of glycolytic enzymes. *Molecular Biology of the Cell* **8**: 1665
- Wolfe KH, Shields DC & others (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**: 708–712
- Yan M, Rachubinski DA, Joshi S, Rachubinski RA & Subramani S (2008) Dysferlin domain-containing proteins, Pex30p and Pex31p, localized to two compartments, control the number and size of oleate-induced peroxisomes in *Pichia pastoris*. *Molecular Biology of the Cell* **19**: 885–898
- Yogev O & Pines O (2011) Dual targeting of mitochondrial proteins: mechanism, regulation and function. *Biochimica et Biophysica Acta* **1808**: 1012–1020
- Yogev O, Singer E, Shaulian E, Goldberg M, Fox TD & Pines O (2010) Fumarase: a mitochondrial metabolic enzyme and a cytosolic/nuclear component of the DNA damage response. *PLoS Biology* **8**: e1000328
- Zala D, Hinckelmann M V, Yu H, Da Cunha MM, Liot G, Cordelières FP, Marco S & Saudou F (2013) Vesicular Glycolysis Provides On-Board Energy for Fast Axonal Transport. *Cell* **152**: 479–491
- Van der Zand A, Braakman I & Tabak HF (2010) Peroxisomal membrane proteins insert into the endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell* **21**: 2057–2065
- Van der Zand A, Gent J, Braakman I & Tabak H (2012) Biochemically Distinct Vesicles from the Endoplasmic Reticulum Fuse to Form Peroxisomes. *Cell* **149**: 397–409
- Zarnack K, Maurer S, Kaffarnik F, Ladendorf O, Brachmann A, Kämper J & Feldbrügge M (2006) Tetracycline-regulated gene expression in the pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology* **43**: 727–738
- Zhang H, Wang L, Deroles S, Bennett R & Davies K (2006) New insight into the structures and formation of anthocyanic vacuolar inclusions in flower petals. *BMC Plant Biology* **6**: 29
- Zheng L, Roeder RG & Luo Y (2003) S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* **114**: 255–266
- Zimmermann R & Neupert W (1980) Biogenesis of Glyoxysomes. *European Journal of Biochemistry* **112**: 225–233

6 Anhang

Tabelle A1: Verdopplungszeit von Δ PTS1-Mutanten in Flüssigkultur

Stamm	Verdopplungszeit (min) 2% Glucose	Verdopplungszeit (min) 0.4% Ölsäure
Wildtyp	119,72 +/- 0,73	555,23 +/- 29,2
<i>gapd</i> Δ PTS1	127,87 +/- 0,94	660,26 +/- 53
<i>mdh1</i> Δ PTS1	123,94 +/- 2,1	633,22 +/- 85,64
<i>gpd1</i> Δ PTS1	120,64 +/- 1,6	1066,58 +/- 149,45
<i>gapd</i> Δ PTS1 <i>mdh1</i> Δ PTS1	140,77 +/- 2,6	644,18 +/- 120,82
<i>gapd</i> Δ PTS1 <i>gpd1</i> Δ PTS1	147,01 +/- 1,05	1769,24 +/- 78,66
<i>mdh1</i> Δ PTS1 <i>gpd1</i> Δ PTS1	153,10 +/- 8,63	1372,31 +/- 190,82
<i>gapd</i> Δ PTS1 <i>mdh1</i> Δ PTS1 <i>gpd1</i> Δ PTS1	149,32 +/- 4,47	1663,49 +/- 172,61
Δ pex6	151,74 +/- 1,29	kein Wachstum

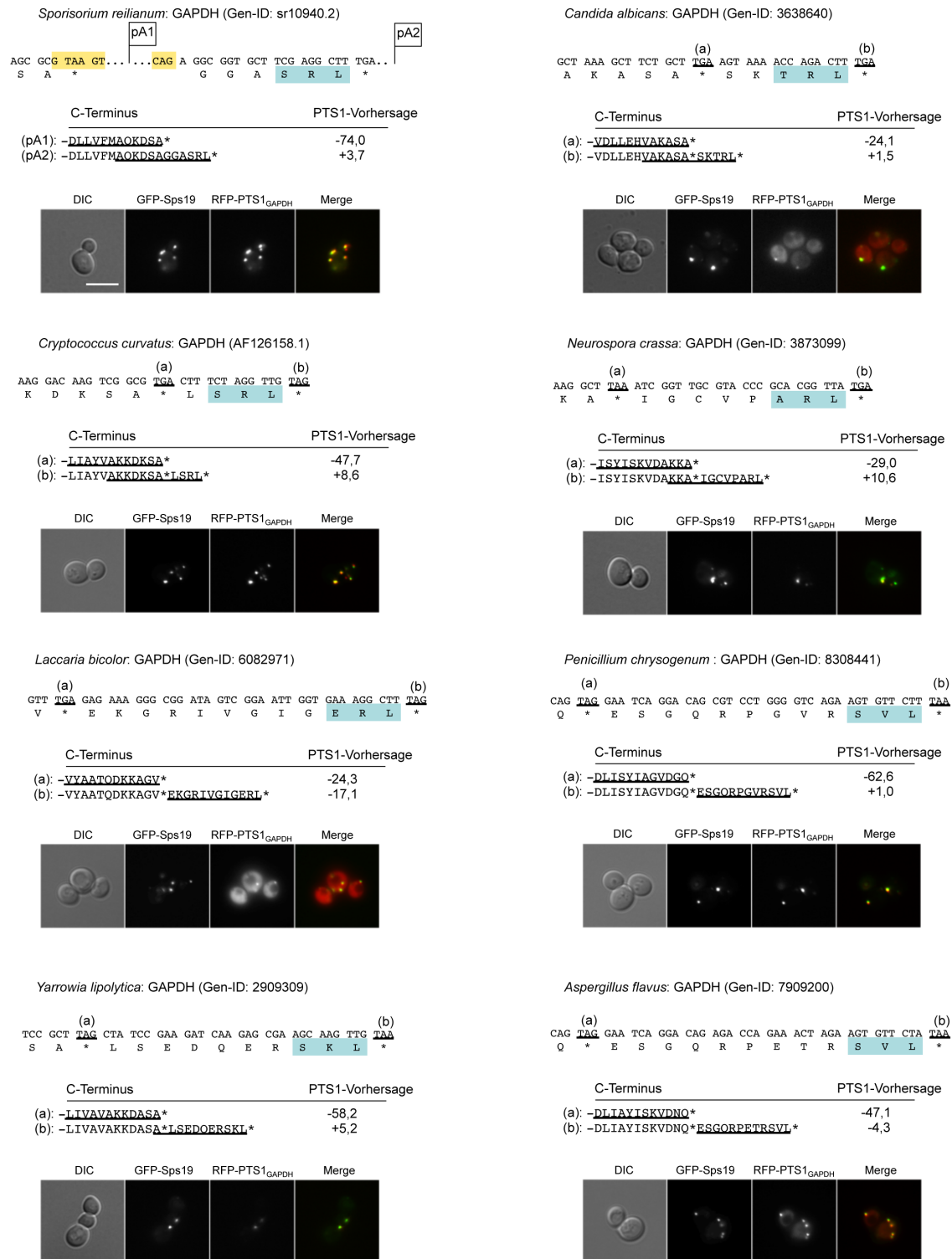


Abbildung Anhang 1: Übersicht über GAPDH Isoformen mit PTS1-Motiv

Die Abbildungen zeigen in Analogie zum Ergebnisteil die Sequenzausschnitte und Lokalisierungsdaten für peroxisomale Isoformen von GAPDH verschiedener Pilze. Die Identifizierungsnummern sind aus NCBI, JGI und MSRDB.

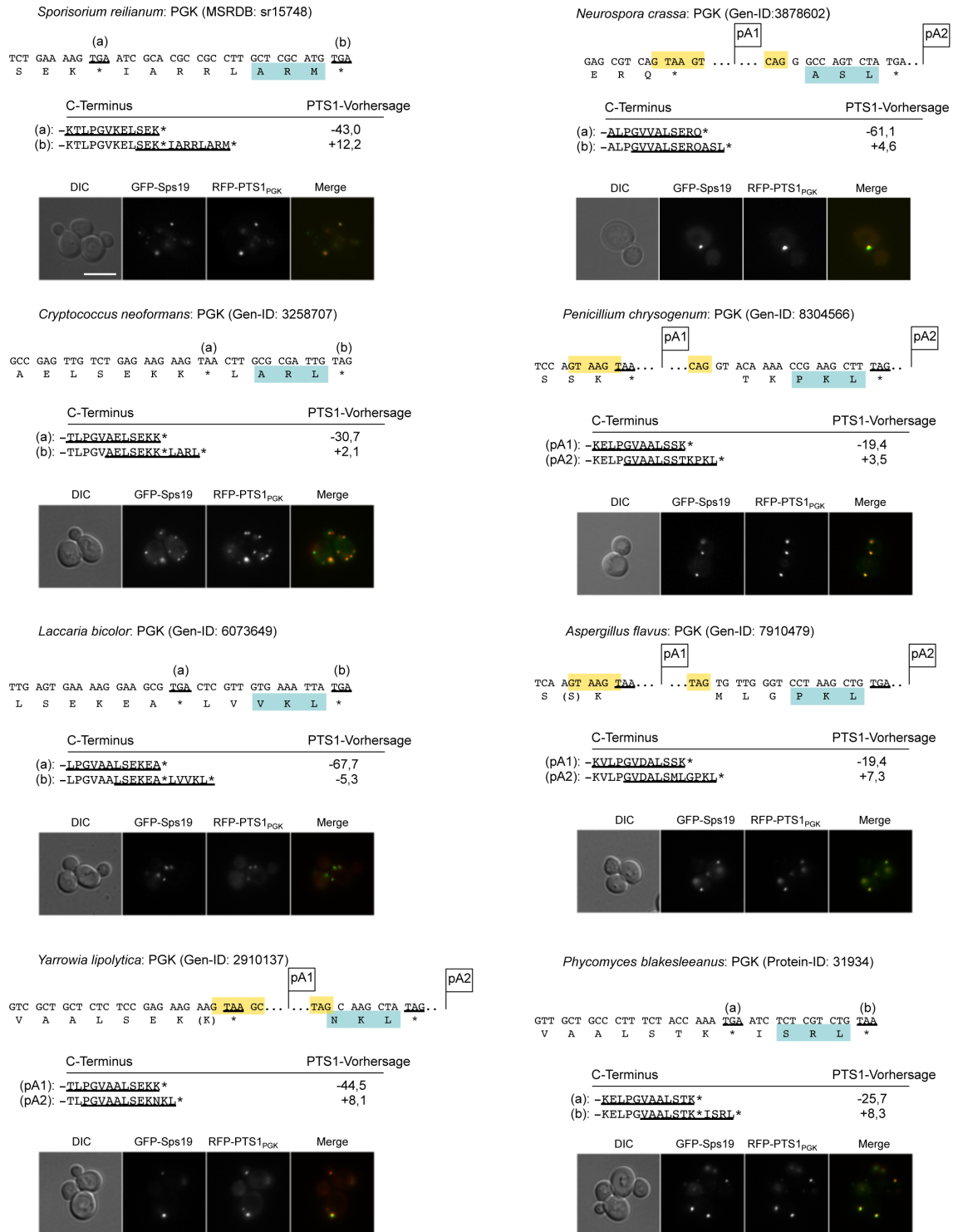


Abbildung Anhang 2: Übersicht über PGK Isoformen mit PTS1-Motiv

Die Abbildungen zeigen in Analogie zum Ergebnisteil die Sequenzausschnitte und Lokalisierungsdaten für peroxisomale Isoformen von PGK verschiedener Pilze. Die Identifizierungsnummern sind aus NCBI und MSRDB.

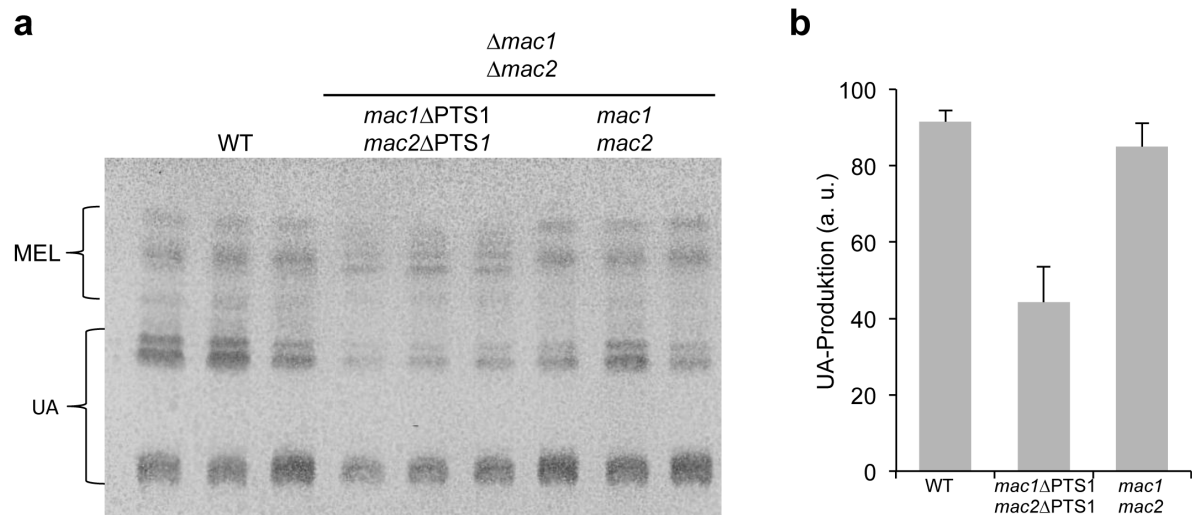


Abbildung 37: Acyltransferasen ohne PTS1 reduzieren die Menge an Ustilaginsäuren

a; Lipidextrakte aus den angegebenen Stämmen wurden mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Durch Besprühen mit einem Gemisch von Essigsäure/Schwefelsäure/Anisaldehyd (50/1/0,5) und durch etwa zweiminütige Inkubation bei 150°C wurden enthaltene Glykolipide sichtbar gemacht.

b; UA-Produktion wurde mit Hilfe von ImageJ quantifiziert. Standardabweichungen ergaben sich aus drei biologischen Replikaten.

Danksagung

Zunächst möchte ich Michael Bölker für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen, aber auch für sein Vertrauen, die unzähligen Diskussionen und Ideen, ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht zu Stande gekommen wäre. Außerdem geht mein Dank an Uwe Maier für das Erstellen eines zweiten Gutachtens, aber auch für die Arbeit, die er sich mit uns im Graduiertenkolleg gemacht hat. Zudem danke ich Regine Kahmann und Renate Renkawitz-Pohl für ihre Bereitschaft der Prüfungskommission anzugehören.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der AG Bölker, AG Mösch und AG Taxis danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre, den regen Austausch von Ideen und Plasmiden und die entspannenden Pausen, bei denen man wieder auftanken konnte. Mein besonderer Dank gilt Alina, Domenica, Julia und Thorsten für die tolle Zusammenarbeit, die ich auch in Zukunft gerne fortführen würde. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch Björn, Jörg, Kai und Uwe für die schöne und erfolgreiche Kooperation. Außerdem danke ich ganz herzlich der ganzen Abteilung für organismische Interaktion am MPI Marburg für die Möglichkeit die Infrastruktur mitbenutzen zu können. In diesem Zusammenhang möchte ich besonders Gunther, Karina, Stefan, und Zippi für ihre Hilfsbereitschaft danken. Danken möchte ich auch Kay und Christian R. für wertvolle Hinweise im IT-Bereich und ihre stetige Diskussionsbereitschaft, wenn es um Wissenschaft ging. Für alle kleinen und großen Dinge neben dem Laboralltag danke ich Birgit, Hanne, Heide-Barbara Böttner, Lucette, Markus Hilgenberg und Ute. Für die vielen Minis und die schöne und friedliche Nachbarschaft möchte ich bei Marisa vielmals bedanken. Für ihre Freundschaft innerhalb und außerhalb des Labors gilt mein großer Dank Andrea, Beate, Britta, Christian B. und Daniel, der schon mein ganzes Studium mein wissenschaftlicher Begleiter war.

Ferner danke ich allen meinen Freunden für die schöne, aber auch häufig knappe Zeit, die wir auch im Verlauf dieser oft zeitintensiven Arbeit miteinander verbracht haben. Insbesondere danke ich Kathi für unsere gemeinsamen Jahre, bedingungslose Freundschaft und auch für die Hilfe bei der Korrektur meiner Arbeit.

Großer Dank geht an meine Eltern, die mir beim Studium geholfen haben, besonders an Conny, auch für das Lesen der ganzen Hieroglyphen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Annette für das schöne Leben, die stetige Unterstützung und die Liebe bedanken, die das Leben lebenswert macht.